

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS BIOQUÍMICAS
Y BIOTECNOLÓGICAS**
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL COLORANTE E-123
“AMARANTO” MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA
RESOLUCIÓN EN BEBIDAS CARBONATADAS. AREQUIPA 2016.**

**Tesis presentada por los bachilleres
en Farmacia y Bioquímica:**

Huerta Cabrera, Diana Elizabeth

Suárez Gutiérrez, Manolo

Para optar el Título Profesional de
Químico Farmacéutico

Asesor: Mgter. Jeaneth Medina Pérez

AREQUIPA – PERÚ

2017

ÍNDICE

Contenido	
RESUMEN.....	1
SUMMARY	3
INTRODUCCIÓN	5
OBJETIVOS	7
HIPÓTESIS.....	8
CAPÍTULO I	
MARCO TEÓRICO.....	9
1. ADITIVOS ALIMENTARIOS.....	10
1.1. COLORANTES	11
1.1.1. Colorantes Naturales	12
1.1.2. Colorantes Sintéticos o Artificiales.....	13
1.1.2.1. Colorantes Azoicos.....	17
1.1.2.1.1. Colorante E-123 “Amaranto”.....	18
2. BEBIDAS CARBONATADAS.....	21
3. CROMATOGRAFÍA.....	22
3.1. TIPOS DE CROMATOGRAFÍA.....	23
3.1.1.1. Placa de Silicagel.....	25
3.1.1.2. Fase Móvil	26
3.1.2. Cromatografía Líquida de Alto Performance (HPLC)	26
3.1.2.1. Partes del Equipo de HPLC	28
3.1.2.1.1. Bombas Impulsadoras	28
3.1.2.1.2. Tuberías	29

3.1.2.1.3. Uniones.....	30
3.1.2.1.4. Sistema de almacenamiento de la fase móvil.....	31
3.1.2.1.5. Inyectores	32
3.1.2.1.6. Detectores	33
3.1.2.1.7. Columna	34
3.1.2.1.8. Sistema de toma y procesamiento de datos	37
3.1.2.2. Fase Móvil	37
4. MÉTODO ANALÍTICO	38
4.1. VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO	38
4.2. PARÁMETROS ANALÍTICOS.....	39
4.2.1. Selectividad o Especificidad.....	39
4.2.2. Linealidad.....	39
4.2.3. Precisión	40
4.2.4. Exactitud.....	40
4.2.5. Sensibilidad	40
CAPÍTULO II	
MATERIALES Y MÉTODOS	42
1. MUESTRA.....	43
2. LUGAR DE INVESTIGACIÓN	43
3. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS	44
3.1 MATERIALES:.....	44
3.2 REACTIVOS:.....	44
3.3 EQUIPOS:	45
4. MÉTODOS	46
4.1 CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (TLC).....	46
4.1.1 Preparación de la placa.....	46

4.1.2	Preparación del estándar de Amaranto	46
4.1.3	Preparación del Estándar a varias concentraciones	47
4.1.4	Preparación de las muestras	47
4.1.5	Siembra del Estándar y de las Muestras	47
4.1.6	Preparación de la fase móvil	47
4.1.7	Corrida de la placa cromatográfica	48
4.1.8	Lectura de la Placa Cromatográfica	48
4.2	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	49
4.2.1	Condiciones Cromatográficas	50
4.2.2	Preparación de la Fase Móvil	50
4.2.3	Preparación de la Solución Stock de Estándar de Amaranto (E-123) 50	
4.2.4	Validación del Método Analítico	51
4.2.4.1.	Linealidad	51
4.2.4.1.1.	Preparación de la curva de calibración.....	52
4.2.4.1.2.	Análisis Estadístico	53
4.2.4.2.	Sensibilidad.....	55
4.2.4.2.1.	Preparación de la solución stock	55
4.2.4.2.2.	Preparación de las diluciones	55
4.2.4.2.3.	Análisis Estadístico	56
4.2.4.3.	Precisión.....	57
4.2.4.3.1.	Preparación del ensayo	57
4.2.4.3.2.	Análisis estadístico	58
4.2.4.3.2.1.	Límites de confianza	60
4.2.4.4.	Exactitud	60
4.2.4.4.1.	Preparación del ensayo	61

4.2.4.4.2. Análisis Estadístico	61
---------------------------------------	----

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
1. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA SEMICUANTITATIVA (THIN LAYER CHROMATOGRAPHY, TLC)	64
2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)	67
2.1. ELECCIÓN DEL TIEMPO DE RETENCIÓN	67
2.2. VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE AMARANTO POR HPLC	68
2.2.1. LINEALIDAD	68
2.2.2. SENSIBILIDAD	71
2.2.3. PRECISIÓN	73
2.2.4. EXACTITUD	75
2.3. DETERMINACIÓN DE AMARANTO EN BEBIDAS CARBONATADAS	76
CONCLUSIONES	84
SUGERENCIAS	85
REFERENCIAS	86
ANEXOS	93

RESUMEN

Estudios previos registrados por la FAO y la OMS sugieren una relación entre el colorante Amaranto (E-123) y efectos cancerígenos, mutagénicos, gonadotóxicos y embriotóxicos. El presente trabajo tuvo por objetivo la identificación y cuantificación del colorante Amaranto E-123 mediante Cromatografía en Capa Fina (TLC) y Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en bebidas carbonatadas rojas.

Para la identificación del colorante por Cromatografía en Capa Fina (TLC) se utilizó un estándar primario de Amaranto E-123 y una fase móvil de n-propanol e hidróxido de amonio (6:4), encontrándose un R_f de 0.52 para dicho estándar. Posteriormente se analizaron 23 muestras de diferentes matrices de las cuales cinco eran bebidas carbonatadas rojas, encontrándose presencia del colorante Amaranto (E-123) en una sola muestra. Por otro lado se realizó un ensayo de TLC-semicuantitativo usando el software ImageJ dando como resultado una concentración de 24.93 mg/L de Amaranto en dicha muestra. Dada la baja sensibilidad de la Cromatografía en Capa Fina (TLC), se optó corroborar los resultados mediante un método por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

El método por Cromatografía Líquida de Alta Resolución fue validado, usando un estándar de Amaranto (E-123) Sigma Aldrich $\geq 98 \%$, una fase móvil isocrática de acetonitrilo y bromuro de cetiltrimetilamonio (50:50), una columna Chromolith RP-18e de 100 - 4.6 mm, con un flujo de 2 ml/min, a una longitud de onda de 350 nm, con un tiempo de retención de 3.5 min; obteniendo como resultado que el método fue lineal con un coeficiente de correlación r^2 de 0.9998, preciso con un coeficiente de variación (CV) de 2.62 % para repetibilidad y valores entre 0.46 y 1.10 % para reproducibilidad, exacto mediante porcentaje de recuperación en una muestra de bebida carbonatada con y sin adición estándar obteniéndose valores de 99.04 a 101.62 % respectivamente. Por otro lado se evaluaron los límites de detección y cuantificación en los que se obtuvo valores de 0.25 y 0.29 mg/L respectivamente.

Para el análisis de las muestras por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), se seleccionaron 5 marcas de bebidas carbonatadas, recolectándose 3 lotes por cada marca y 3 muestras por lote, las cuáles fueron inmediatamente llevadas al laboratorio para su análisis por HPLC, donde se determinó que en 2 marcas había presencia del colorante Amaranto (E-123) en concentración de (19.2 ± 0.7) mg/ L y (1.6 ± 0.1) mg/L, encontrándose que dichos valores están por encima de los Límites Máximos Permisibles de la norma peruana según el Artículo No 063 del Reglamento sobre vigilancia y control sanitario de alimentos y bebidas, aprobado mediante el Decreto Supremo No 007-98-SA (Ver Anexos) que lo prohíbe para el consumo humano representando un riesgo para la salud.

Palabras Clave: Cromatografía, Cromatografía Líquida, Cromatografía en capa Fina, Cromatografía Líquida de Alta Resolución, colorantes, colorantes azoicos, Amaranto, E-123, bebidas carbonatadas, validación.

SUMMARY

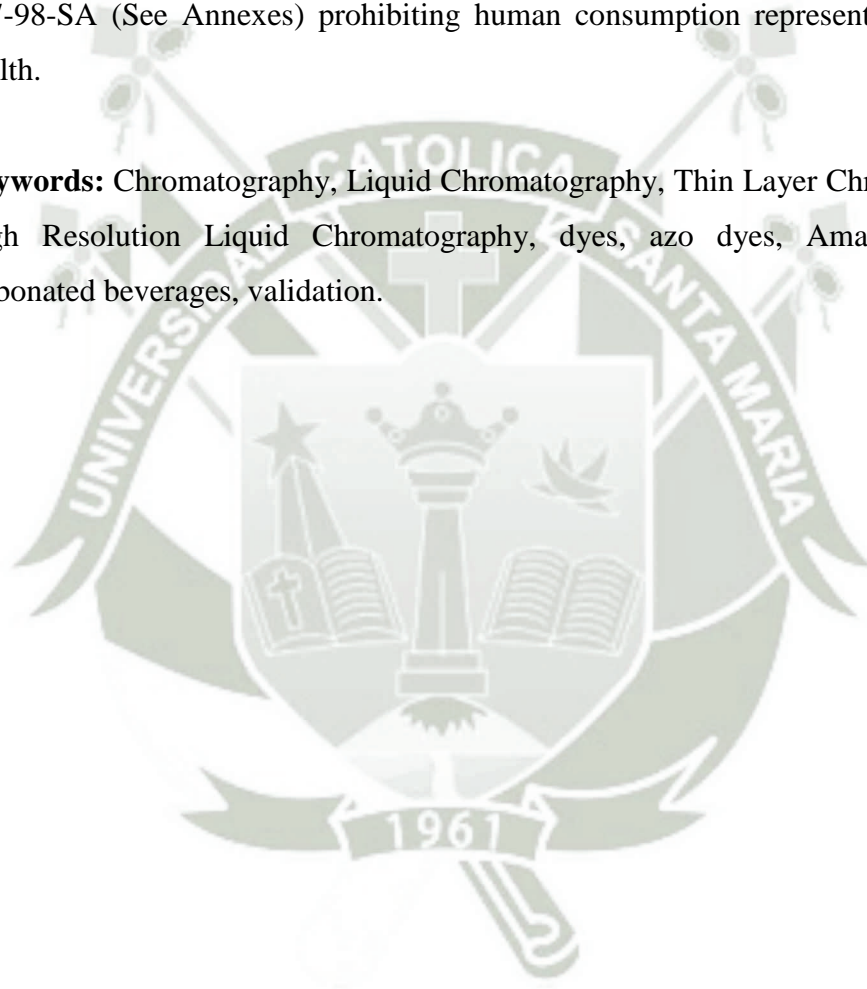
Previous studies by FAO and OMS suggest a relationship between the amaranth dye (E-123) and carcinogenic, mutagenic, gonadotoxic and embryotoxic effects. The objective of the present work was to identify and quantify the Amaranth E-123 by thin-layer chromatography (TLC) and high-performance liquid chromatography (HPLC) in red carbonated beverages.

A primary standard of Amaranth E-123 and a mobile phase of n-propanol and ammonium hydroxide (6: 4) were used for the identification of the dye by cover chromatography (TLC), with an R_f of 0.52 for the said standard. Subsequently, 23 samples of different matrices of the five cups of the red carbonated drinks were analyzed, finding the presence of the color Amaranth (E-123) in a single sample. On the other hand, a TLC-semiquantitative assay was performed using the ImageJ software resulting in a concentration of 24.93 mg/L of Amaranth in sample sample. Given the low sensitivity of thin layer chromatography (TLC), we opted to corroborate the results using a High Resolution Liquid Chromatography (HPLC) method.

The high resolution Liquid Chromatography method was validated using a Sigma Aldrich $\geq 98\%$ Amaranth standard (E-123), an isocratic mobile phase of acetonitrile and cetyltrimethylammonium bromide (50:50), a Chromolith RP-18e column of 100 - 4.6 mm, at a flow rate of 2 ml / min, at a wavelength of 350 nm, with a retention time of 3.5 min; With the result that the method was linear with a correlation coefficient r^2 of 0.9998, accurate with a coefficient of variation (CV) of 2.62% for repeatability and values between 0.46 and 1.10% for reproducibility, exact by percentage of recovery in a sample of Carbonated beverage with and without standard addition obtaining values of 99.04 to 101.62% respectively. On the other hand, the limits of detection and quantification were evaluated, in which values of 0.25 and 0.29 mg / L were obtained respectively.

For the analysis of samples by High Resolution Liquid Chromatography (HPLC), 5 brands of carbonated beverages were selected, collecting 3 batches for each brand and 3 samples per batch, the cuacas were immediately taken to the laboratory for analysis by HPLC, where It was determined that in two brands there was presence of the Amaran dye (E-123) in concentration of $(19,2 \pm 0,7)$ mg / L and $(1,6 \pm 0,1)$ mg / L, being found that the values are Above the Maximum Permissible Limits of the Peruvian norm according to Article No. 063 of the Regulation on Sanitary Surveillance and Control of Foods and Beverages, approved by Supreme Decree No. 007-98-SA (See Annexes) prohibiting human consumption representing a Risk to health.

Keywords: Chromatography, Liquid Chromatography, Thin Layer Chromatography, High Resolution Liquid Chromatography, dyes, azo dyes, Amaranth, E-123, carbonated beverages, validation.



INTRODUCCIÓN

Los aditivos alimentarios, son las sustancias que se pueden añadir a los alimentos o bebidas, pero en cantidades controladas, no tiene ningún valor nutritivo; se adicionan con un fin tecnológico y no debe alterar las características iniciales del producto. Dentro de los aditivos alimentarios, encontramos a los colorantes azoicos que son uno de los más usados a lo largo de los años por la versatilidad que tienen, y por ser muy resistentes y económicos; el colorante rojo Amaranto pertenece a este grupo.

El Amaranto, también conocido como E-123 fue muy utilizado, en medicamentos, productos de repostería, bebidas alcohólicas, bebidas carbonatadas y no carbonatadas, etc. Con el paso de los años se le atribuyó diversos problemas cancerígenos, mutagénicos y teratogénicos. A mediados de la década de los 70 unos investigadores Rusos realizaron investigaciones, concluyendo que el Amaranto producía cáncer en animales de experimentación, y también presentaba efectos gonadotóxicos y embriotóxicos; un estudio de Collins y McLaughlin en ratas en la misma década mostró un efecto relacionado con el número de fetos vivos por cada rata, indicando un efecto feto tóxico específico.

El Amaranto por ser un colorante azoico presenta grupos amino, aumentando la toxicidad de los grupos aromáticos por la formación de metahemoglobina. También puede presentar diversos problemas en personas con hipersensibilidad a los salicilatos, además es un gran liberador de histamina, produce hiperactividad en niños cuando se utiliza junto con benzoatos.

Esto origino muchos estudios realizados en Estados Unidos que obtuvieron resultados muy contradictorios, indicaron que el colorante atraviesa la placenta, produce alteraciones en los cromosomas; por ser considerado de riesgo es que su uso fue prohibido por la Legislación Norteamericana desde 1976. En la Comunidad Europea es aceptado su uso, pero en algunos países de este continente lo han prohibido.

El Amaranto, es muy utilizado en los alimentos sólidos, bebidas y productos farmacéuticos en más de 60 países. La FAO y la OMS determinaron que el colorante se podía consumir con seguridad en cantidades de hasta 1,5 mg/día.

Existen diversos métodos analíticos para la determinación del colorante Amaranto en alimentos y bebidas. El desarrollo del método analítico usando Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en la determinación del colorante Amaranto, ofrece las siguientes ventajas respecto a otros métodos:

- Bajos costos.
- Mayor sensibilidad.
- No se requiere una extracción previa.
- Las matrices necesitan poca o ninguna preparación.
- Sencillez de trabajo
- Facilidad de repetibilidad y reproducibilidad.

Estas ventajas justifican la aplicación de la metodología analítica por HPLC en el presente trabajo.

En el Perú su uso está prohibido en medicamentos por la DIGEMID mediante la Resolución Directoral No 139-2012 DIGEMID-DG-MINSA, y también prohibido para el consumo humano por la DIGESA según lo dispuesto en el Artículo No 045 de “Reglamento sobre vigilancia y control sanitario de alimentos y bebidas” aprobado mediante el Decreto Supremo No 007-98-SA (Ver Anexos).

OBJETIVOS

1. Evaluar cualitativa y semicuantitativamente mediante Cromatografía en Capa Fina (TLC) la presencia del colorante Amaranto (E-123) en diferentes matrices.
2. Validar la técnica para la determinación del colorante Amaranto (E-123) mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en bebidas carbonatadas.
3. Detectar y cuantificar la presencia y concentración del colorante Amaranto (E-123) en bebidas carbonatadas.
4. Comparar los niveles del colorante Amaranto (E-123) encontrados en bebidas carbonatadas con los niveles de ingesta diaria admisible (IDA) permitidos para el colorante.
5. Evaluar los niveles del colorante Amaranto (E-123) encontrados en las diversas muestras de bebidas carbonatadas, frente a la Normativa Peruana.

HIPÓTESIS

Teniendo en cuenta los efectos negativos sobre la salud del Amaranto, será probable que las bebidas carbonatadas de color rojo expendidas en nuestro entorno contengan este colorante; será necesario determinar y cuantificar el dicho colorante mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), para asegurar el cumplimiento de los niveles permitidos y en resguardo de la salud pública.





CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1. ADITIVOS ALIMENTARIOS

Según la Norma Técnica Peruana 209.038 del 2009, basándose en el *CODEX Alimentarius* Mundi de la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y de la Organización Mundial de la Salud (OMS), indica que los aditivos alimentarios (Figura 1) son todas las sustancias que pueden ser añadidas en cantidades controladas a los alimentos y bebidas, que no presentan ningún valor nutritivo, cuya adición es para un fin tecnológico en la fabricación, elaboración, tratamiento, empaquetado o envasado que provoque que se afecten sus características ⁴.

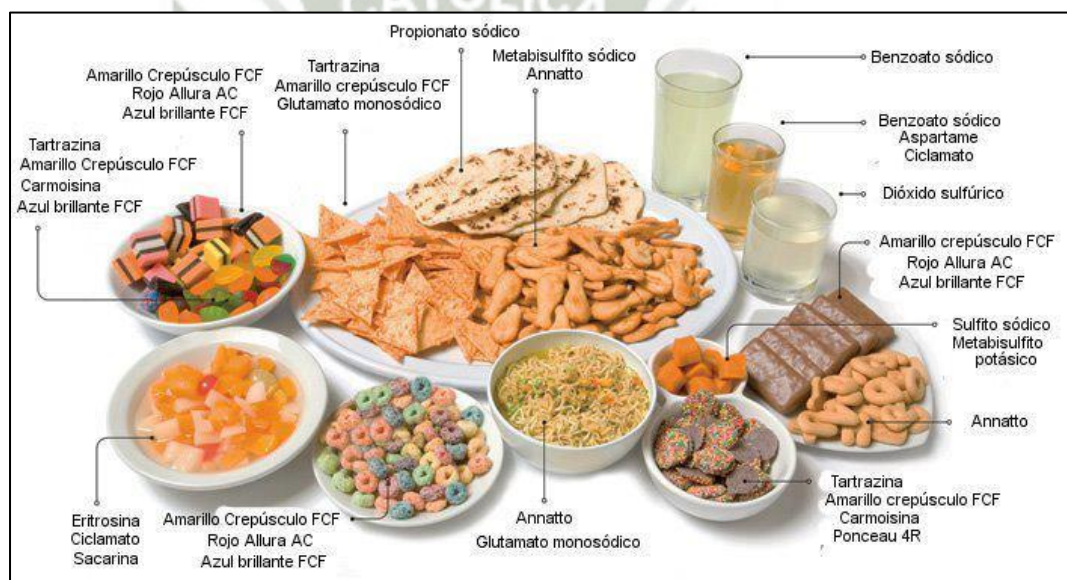


Figura 1. Aditivos Alimentarios.

La adición de estas sustancias se atribuyó desde la prehistoria con el fin de que los alimentos que consumían resultaran más apetitosos y se conserven mejor. No es hasta finales del siglo XIX cuando es recién incluido el término “aditivo” ^{2,3}.

Para garantizar la buena salud los aditivos deben de ser inocuos y no deben de contener sustancias dañinas; al contrario su uso debe de suponer múltiples

beneficios para el consumidor; es por eso que existen diversos comités creados por la FAO y la OMS que evalúan diversos aspectos de los aditivos ^{1,2}.

La Codificación Europea designa a los aditivos por la letra E seguida por una cifra que indica la función del aditivo, ya que sus nombres pueden ser muy complicados debido a su nomenclatura química ¹. Se clasifican en:

- Colorantes (E-100 – E-180).
- Conservantes (E-200 – E-290).
- Antioxidantes (E-300 – E-322).
- Agentes emulsionantes, estabilizantes, espesantes y gelificantes (E-400 – E-483).
- Potenciadores del sabor (E-620 – E-637).
- Edulcorantes (E-950 – E-967).
- Antiapelmazantes (E-504 – E-572).
- Reguladores del pH (E-260, E-270, E-330, etc.).
- Gasificantes (E-290, E-503, E-339, etc.).
- Otros.

1.1. COLORANTES

Son sustancias sin valor nutritivo que proporcionan color a un alimento o le restituyen su color inicial si ha sido modificado en la elaboración; con el objeto de hacer más atractivo el producto, aumentar su aceptación por el consumidor y determinar la preferencia de un alimento frente a otros de la misma clase ^{4,5}.

Los colorantes (Figura 2) se utilizan desde hace mucho tiempo para poder mejorar el aspecto de los alimentos. El coloreado artificial se da desde que estos se realizaban de forma elaborada, para esto se utilizaban extractos vegetales o pigmentos minerales que eran demasiado tóxicos; a mediados del siglo XIX se obtuvo colorantes orgánicos sintéticos, sin embargo por sus efectos adversos muchos de estos colorantes fueron prohibidos ⁸.



Figura 2. Colorantes.

Actualmente se recurren a colorantes naturales en vez de colorantes sintéticos, el principal problema es que estos son más caros, menos potentes y menos estables que los sintéticos, es por eso que la industria alimentaria sigue usando los colorantes sintéticos a pesar de los diversos problemas que causan ^{2,4}.

Se clasifican en:

- Colorantes Naturales.
- Colorantes Sintéticos.

1.1.1. Colorantes Naturales

Los colorantes naturales (Figura 3) son extraídos de una sustancia animal, vegetal o mineral; son considerados inocuos y de menor riesgo que los colorantes sintéticos, algunos de ellos son: cochinilla, curcumina, carotenoides, betaína, etc. ².

En la actualidad el uso de los colorantes naturales en la alimentación ha sido reemplazado por los colorantes artificiales, ya que son más estables, proporcionan mejores colores, sus costos son menores, entre otros factores ⁹.



Figura 3. Colorantes Naturales.

Fuente: <http://elcomercio.pe/>

1.1.2. Colorantes Sintéticos o Artificiales

Los colorantes sintéticos (Figura 4) son los más importantes en la actualidad, estos no existen en la naturaleza y pueden ser aislados en el laboratorio. Alcanzaron su máximo apogeo en el siglo XIX; ya en 1860 se coloreó el vino con fucsina en Francia y más adelante la mantequilla con dinitrocresol ^{2,8}.



Figura 4. Colorantes Artificiales.

Fuente: <http://elcomercio.pe/>

Estos colorantes son más fáciles de usar y más resistentes a la luz, a la temperatura, al pH, etc., que los colorantes naturales; aunque algunas veces estos también presentan problemas, por ejemplo, se pueden decolorar por presencia del ácido ascórbico que está presente en muchas bebidas refrescantes ya que es un gran antioxidante. Los colorantes sintéticos deben ser inocuos, tener gran poder de tinción, ser compatible con los productos a teñir, no poseer ningún olor

ni sabor desagradables y ser lo más económicos posibles. La mayoría de estos son solubles en agua por la presencia de grupos de ácido sulfónico ^{2,9}.

La preocupación por la seguridad de la salud en el uso de los colorantes sintéticos ha llevado a que estos sean estudiados de forma más exhaustiva que los colorantes naturales, reduciendo significativamente el número de colorantes que se pueden utilizar, además cada colorante tiene un límite (Tabla 1) que varía según la sustancia y el alimento utilizados ².

Aunque la estructura química de estos colorantes ha sido modificada durante el paso de los años, de manera que la mayoría ya no se descomponen en el organismo, sino que son eliminados por completo, todavía existe cierto riesgo, como son las reacciones alérgicas, siendo las personas que sufren de asma y las que no toleran al ácido acetil salicílico las que peor toleran los colorantes azoicos ⁷.

Tabla 1. Efectos y límites de algunos colorantes según la UE.

Nombre	Característica	Aplicación	Efectos y Límites
Cantaxantina	Color rojo estable	Se aplica al alimento de salmón y truchas en piscigranjas.	Se le asocia a lesiones a la retina. IDA: 0,3 mg/Kg peso.
Tartrazina	Color amarillo limón	Producto de repostería, fabricación de galletas, sopas preparadas, conservas, bebidas, etc.	Produce reacciones alérgicas y efectos cancerígenos. IDA: hasta 7,5 mg/Kg.
Rojo Cochinilla A	Color de “fresa”	Confitería, repostería, helados.	Efectos cancerígenos. IDA: hasta 4 mg/Kg.
Amarillo de quinoleína	Color de “naranja”	Bebidas refrescantes y alcohólicas.	Se absorbe menos del 3% en el aparato digestivo. IDA: hasta 0,5 mg/Kg.
Eritrosina	Color de fresa poco estable	Postres lácteos y confitería.	Baja absorción intestinal. IDA: hasta 0,6 mg/Kg.

Fuente: Aditivos Alimentarios, Universidad Pública de Navarra ².

Actualmente existen muchas clasificaciones de los colorantes sintéticos, en este caso nos basaremos en la clasificación de acuerdo a la constitución química

de los colorantes, teniendo en cuenta que esta clasificación puede ser muy compleja, difícil y variada ¹⁰; se pueden dividir en:

- Nitro-colorantes.
- Nitroso-colorantes.
- Colorantes Azoicos (Figura 5).
- Colorantes de Difenilmentano.
- Colorantes de Trifenilmentano.
- Colorantes de Xanteno.
- Colorantes de Difenilamina.
- Colorantes Heterocíclicos.
- Colorantes del grupo del Índigo.
- Colorantes del grupo de la Antraquinona.
- Colorantes de Azufre.

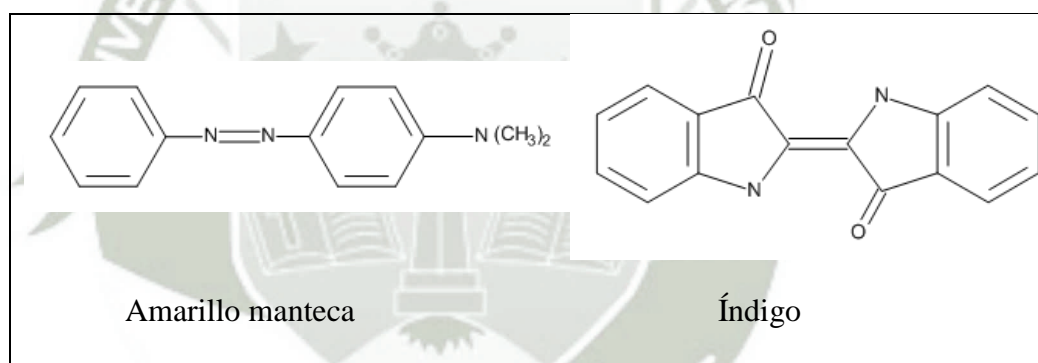


Figura 5. Estructura de algunos colorantes.

Fuente : Software ChemDraw®.

También se pueden clasificar por categorías desde el punto de vista toxicológico en varias categorías ⁹:

- **Categoría A:** Colorantes admitidos para uso alimentario.
- **Categoría B:** Colorantes que no han sido estudiados para ser de categoría A.
- **Categoría C-I:** Colorantes no estudiados exhaustivamente, pero no están relacionados con efectos tóxicos.

- **Categoría C-II:** Colorantes con evaluaciones incompletas, pero no se conocen con resultados tóxicos a larga duración, ni con procesos cancerígenos.
- **Categoría C-III:** Colorantes con pocos datos para ser evaluados, pero que han tenido efectos perjudiciales con la salud.
- **Categoría D:** Colorantes sin ningún estudio, pero hay datos de su posible toxicidad.

Desde hace muchos años los colorantes son vistos como potencialmente tóxicos; la toxicidad de los colorantes está relacionada con su absorción en el organismo, es decir, no es lo mismo utilizar un colorante en productos para la aplicación en la superficie corporal, que ingerir el colorante mediante un medicamento, alimento o bebida ⁹.

Los colorantes sintéticos son regulados por varias legislaciones a nivel mundial, las más importantes son:

- **Legislación Europea:** Todos los aditivos alimentarios deben tener un propósito demostrado, y se deben de someter a una evaluación científica precisa y completa para así poder garantizar su seguridad. El comité encargado de esto es el Comité Científico para la Alimentación Humana de la Unión Europea (Scientific Committee for Food, SCF). Las principales normas de la Unión Europea son la Directiva 94/36/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, relativa a los colorantes usados en alimentos y bebidas, y la Directiva 95/45/CE de la Comisión, en la que se establecen los criterios de pureza de los colorantes. Todos los aditivos colorantes autorizados han sido evaluados por el SCF, asignándole un límite de Ingesta Diaria Admisible (IDA) ⁹.
- **Legislación de Estados Unidos:** En 1900 habían casi 80 aditivos colorantes disponibles en alimentos; en 1906 The Food and Drug Act permitió solo a siete aditivos colorantes y se estableció un programa de certificación administrado por el Departamento de Agricultura de

Los Estados Unidos (USDA). En 1938 se dio la Ley Federal de Alimentos, Drogas y Cosméticos (FD&C), que hacia obligatoria la certificación de todos los aditivos colorantes y transfirió la autoridad a la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) y se establecieron tres categorías:

- *Comida, Droga y Cosméticos (FD&C)*: Colorantes cuya aplicación sea en comida, drogas y cosméticos.
- *Droga y Cosméticos (D&C)*: Colorantes con aplicación en drogas y cosméticos.
- *Droga y Cosmético externo (D&C external)*: Colorantes que se aplican en drogas y cosméticos que se usan externamente.

En 1959 se promulgó la cláusula de Delaney llamada así por el congresista James Delaney que prohíbe agregar cualquier sustancia a los alimentos que haya causado cáncer en animales de experimentación ²².

A nivel Internacional hay un Comité Conjunto de Expertos en Aditivos Alimentarios (Join Expert Committee on Food Additives, JECFA) que trabaja bajo el amparo de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO); este comité analiza los resultados de pruebas sometidas en animales y en humanos, determinando un nivel dietético máximo del aditivo, que no contenga efectos tóxicos, denominado “nivel sin efecto adverso observado” (no observed adverse effect level, NOAEL), usado para determinar la cantidad Ingesta Diaria Admisible (IDA) ²².

1.1.2.1. Colorantes Azoicos

De todos los tipos de colorantes, los azoicos son los más versátiles y con el paso de los años han conseguido un sinnúmero de aplicaciones, esto se debe a que se pueden sintetizar muchos colores variando sus estructuras químicas, además son muy resistentes y económicos. Estos colorantes forman parte de

una familia muy peculiar que se caracteriza por la presencia de un nitrógeno unido a anillos aromáticos (Figura 6) ^{9,11}.

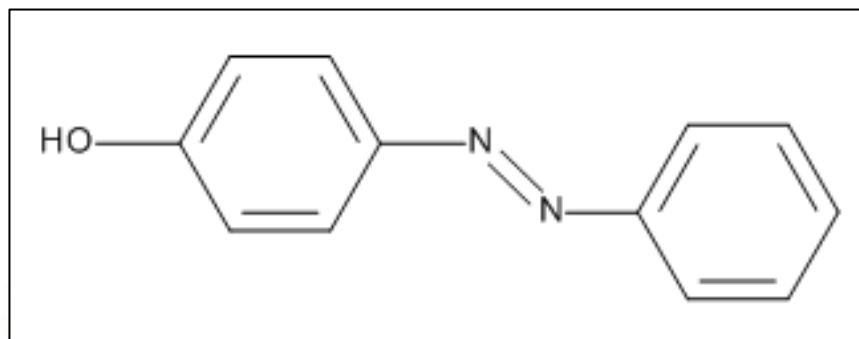


Figura 6. Estructura del grupo azo.

Fuente : Software ChemDraw®.

En la actualidad el número permitido de estos colorantes es muy pequeño en comparación con los existentes, debido a sus efectos que son potencialmente perjudiciales para la salud, por causar reacciones alérgicas, ser potencialmente cancerígenos, provocar alteraciones en el comportamiento y aprendizaje de los niños y adolescentes ⁹.

En 1939, algunos científicos japoneses comprobaron que un colorante sintético muy usado causaba cáncer en animales de experimentación, esto llevó a la prohibición de todos los colorantes azoicos en la alimentación, solo después de largos estudios, éstos fueron permitidos nuevamente; aún en la actualidad dicha toxicidad de los colorantes azoicos es muy discutida ⁷.

1.1.2.1.1. Colorante E-123 “Amaranto”

El Amaranto también conocido como E-123, Rojo No 2, Rojo Ácido 27, Azorrubina S o Rojo 9 (Figura 7); es una sal sódica cuya fórmula molecular es $C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$; su fórmula química la podemos observar en la Figura 8, cuyo nombre es 2-hidroxi-1-(4-sulfonato-1-naftilazo)-naftaleno-3,6-disulfonato trisódico, junto con Cloruro Sódico o Sulfato Sódico ¹².

Este colorante es utilizado mayormente en la repostería, como principal colorante rojo, en golosinas como caramelos y gomas, en bebidas alcohólicas como los vinos, en bebidas carbonatadas y no carbonatadas, en medicamentos, y en algunos países de Europa también se utiliza para dar la coloración al caviar. Su presentación es en polvo o en gránulos de color pardo rojizo. Debe ser almacenado en lugares secos, de preferencia oscuros y a temperatura ambiente. La ingesta máxima diaria debe ser de 1,5 mg/Kg de peso corporal ^{9,12}.



Figura 7. Colorante Amaranto.
Fuente: Sigma-Aldrich.

Debido a que es un colorante azoico puede presentar diversos problemas en personas con hipersensibilidad a los salicilatos, además es un gran liberador de histamina, produce hiperactividad en niños cuando se utiliza junto con benzoatos. También se le atribuyen problemas de mutagénicos y teratogénicos debido a varios estudios en animales de experimentación, es por eso que su uso ha sido restringido en diversos países como Estados Unidos, Rusia y Algunos países de Europa ¹².

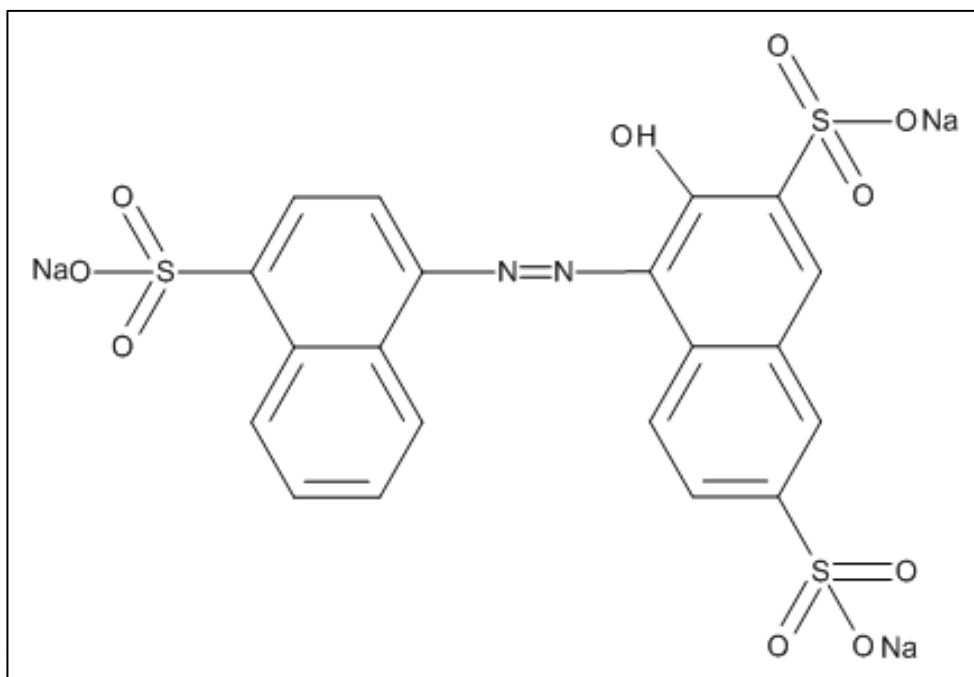


Figura 8. Estructura del colorante Amaranto.

Fuente: Software ChemDraw®

En el Perú su uso está prohibido en medicamentos por la DIGEMID mediante la Resolución Directoral No 139-2012 DIGEMID-DG-MINSA, y también prohibido para el consumo humano por la DIGESA según lo dispuesto en el Artículo No 063 de “Reglamento sobre vigilancia y control sanitario de alimentos y bebidas” aprobado mediante el Decreto Supremo No 007-98-SA (Ver Anexos).

EFFECTOS TÓXICOS:

Este colorante es el más antiguo y el más utilizado del siglo pasado, siendo cuestionada su seguridad desde 1970. Primero unos investigadores Rusos publicaron que producía cáncer en animales de experimentación^{23,24}; y también efectos gonadotóxicos y embriotóxicos^{25,26}; un estudio de Collins y McLaughlin en 1972 en ratas Osborne-Mendel mostró un efecto dosis-relacionado sobre el número de fetos vivos por cada rata, el número de camadas con uno o más y dos o más reabsorciones y el número de camadas totalmente reabsorbidas, indicando un efecto feto tóxico específico. Sin embargo, no se observó ningún efecto en el peso medio de

los fetos, y no aparecieron anomalías esqueléticas o de tejidos blandos en los animales de experimentación ²⁶.

La Presencia de grupos amino aumenta la toxicidad de los compuestos aromáticos, porque están involucrados en la formación de metahemoglobina en los seres humanos ²⁷. Por otro lado, la presencia del enlace azo aumenta la carcinogenicidad debida a intermedios electrófilos reactivos que pueden unirse covalentemente al DNA ²⁸.

Esto dio lugar a muchos estudios realizados en Estados Unidos que obtuvieron resultados contradictorios, indicaron que el colorante atraviesa la placenta, produce alteraciones en los cromosomas; aunque no se pudo confirmar los riesgos del amaranto pero por ser considerado de riesgo es que su uso fue prohibido por la Legislación Norteamericana desde 1976. En la Comunidad Europea es aceptado su uso, pero en algunos países de este continente lo ha prohibido ⁹.

Se evidenciaron efectos genotóxicos fueron evidenciados en el año de 1988 con una prueba cromosómica in vitro usando una línea de células de fibroblastos ⁴⁰, y en la evaluación de colorantes alimenticios azoicos para mutagenicidad e inhibición de la mutagenicidad por métodos utilizando *Salmonella typhimurium* ³⁹.

El colorante rojo Amaranto es muy utilizado en los alimentos sólidos, bebidas y productos farmacéuticos en más de 60 países. La FAO y la OMS determinaron que el colorante se podía consumir con seguridad en cantidades de hasta 1,5 mg/kg/día (para un hombre promedio de 60 kg) ²⁶.

2. BEBIDAS CARBONATADAS

Las bebidas carbonatadas (Figura 9) son bebidas saborizadas, coloreadas, gasificadas (efervescentes) y sin alcohol; se suelen consumir frías para evitar la

pérdida de dióxido de carbono que es el compuesto que le otorga la efervescencia. En América la fabricación de estas comienza en 1832 en Nueva York por John Matthews quien inventó una máquina para mezclar agua con gas de dióxido de carbono y con saborizantes y colorantes. En esas épocas las gaseosas eran muy vendidas en farmacias como un remedio para curar diversos males ¹³.

La Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) asegura que las bebidas carbonatadas son saludables e inocuas, y que la información que llevan en la etiqueta es verás, es por eso que ha establecido las Prácticas Corrientes de Buena Fabricación (CGMP), las cuales describen los pasos básicos que se debe seguir para su elaboración y distribución. La FDA también regula la utilización de aditivos y colorantes alimentarios que sean inocuos para la salud.

Todos los aditivos alimentarios utilizados en las bebidas carbonatadas deben de tener la aprobación de cada país para poder utilizarlos, ya que muchos de ellos producen efectos muy nocivos para el consumo humano; como los colorantes que la mayoría son sintéticos y pueden causar reacciones alérgicas, hiperactividad y en muchos casos causan cáncer.

Todos los fabricantes de bebidas carbonatadas deben de ser muy cuidadosos en el uso de colorantes aprobados y certificados, y si son de exportación deben contar también con las regulaciones del país de destino. En muchas partes del mundo existen fabricantes de bebidas que son inescrupulosos que usan aditivos sin la debida certificación. La principal duda en el uso de los colorantes sintéticos es la dosificación adecuada; hasta el momento no se han presentado casos certificados de accidentes por intoxicación o por abuso de éstos ⁹.

3. CROMATOGRAFÍA

La cromatografía fundamentalmente es una técnica física empleada para separar y cuantificar una gran variedad de sustancias; permitiendo la separación

y distribución de los componentes de una muestra por medio de dos fases una estacionario o inmóvil y otra móvil ^{14,17}.

Es un proceso físico en el cual la fase móvil transporta una mezcla a lo largo de una capa o columna que contiene a la fase estacionaria; a medida que la fase móvil fluye por la fase estacionaria, los solutos se van distribuyendo entre ambas fases, los que son más afines a la fase móvil viajan más rápido que los que no lo son ¹⁷.

3.1. TIPOS DE CROMATOGRAFÍA

Las separaciones cromatográficas pueden clasificarse en tres formas: de acuerdo al estado físico de la fase móvil y estacionaria, según el método de contacto entre estas fases y según los mecanismos físicos de separación (Tabla 2.).

Tabla 2. Tipos de Cromatografía según su fase móvil.

cromatografía	Fase móvil	Fase estacionaria	soporte	mecanismo	Nombre
	gas	líquido	columna	reparto	cromatografía gas-líquido
		sólido		adsorción	cromatografía gas-sólido
	líquido	líquido	columna	reparto	cromatografía líquido-líquido
					cromatografía en papel
		sólido	plano	adsorción	cromatografía en capa fina
					cromatografía líquida-sólido
			columna	intercambio iónico	cromatografía intercambio iónico
				tamaño molecular	Cromatografía de exclusión por tamaño
		resina			
		gel			

Fuente: Elaboración propia

3.1.1. Cromatografía en capa fina (TLC)

La cromatografía en capa fina, CCF o TLC (Thin Layer Chromatography en la terminología inglesa) consta de un sistema de dos fases, una sólida (fase estacionaria) que es una capa delgada y absorbente fijada en una placa o lámina firme de vidrio, aluminio o plástico que actúa como soporte. A través de la fase estacionaria transita un solvente o (fase móvil); todo esto se coloca en una cámara cromatográfica herméticamente cerrada (Figura 9). La fase estacionaria será por lo general más polar que la fase móvil de forma que la fase estacionaria retenga el analito que se necesite ¹⁸.

La cromatografía en capa fina presenta varias ventajas sobre otros métodos siendo de coste relativamente bajo, precisa una metodología simple de resultados fácilmente reproducibles lo que permite que sea adecuado para una prueba piloto ¹⁸.

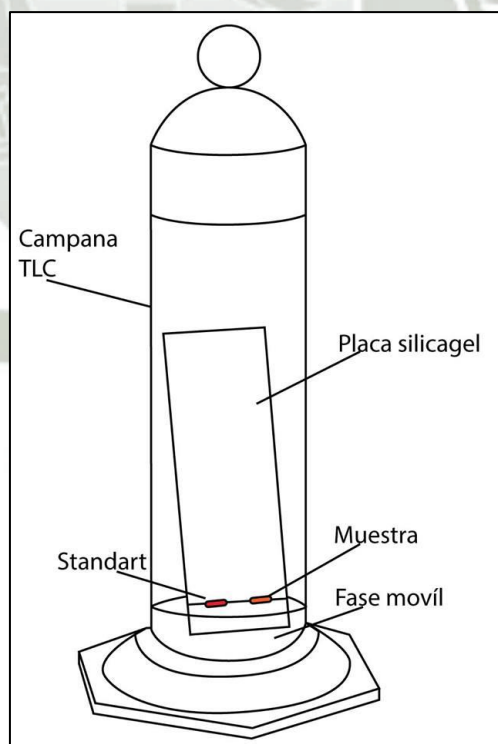


Figura 9. Montaje para cromatografía de capa fina (TLC).

Para este método se utilizan como soporte placas de vidrio, plástico o aluminio, en las que se deposita una capa fina de adsorbente que puede ser gel de sílice, almidón, polvo de celulosa, etc. En una de las bases de la placa, a la altura de 1 cm aproximadamente se marca débilmente con un lápiz fino una línea teniendo cuidado de no romper la placa adsorbente; esta línea servirá de base para sembrar las muestras que se quieren analizar. Después de aplicar la muestra se deja secar a temperatura ambiente o con una secadora; esta placa se introduce en una cubeta que contiene el disolvente a utilizar (fase móvil), cuyo nivel no debe llegar nunca a la línea de la siembra. El ascenso de la fase móvil por capilaridad produce el efecto cromatográfico. Las sustancias son visualizadas en la placa mediante su color, por absorción ultravioleta o por un revelado ¹⁹.

Una vez revelada la placa se establece el coeficiente de relación entre la distancia recorrida por la fase móvil y la distancia alcanzada por la sustancia a analizar, esta relación se denomina R_f ¹⁹.

La cromatografía de capa fina y la cromatografía de líquidos son muy semejantes por el tipo de fase estacionaria, tipo de fase móvil y sus aplicaciones. De hecho las placas de cromatografía de capa fina pueden ser útiles para establecer condiciones óptimas de separación en HPLC. Algunos investigadores sostienen que los estudios en cromatografía de capa fina deben preceder siempre a los experimentos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución ²¹.

3.1.1.1.Placa de Silicagel

El gel de sílice, se trata de un adsorbente polar débilmente ácido, cuyo pH va de 4 a 5. Por lo que no se debe utilizar con sustancias que se corrompan con los ácidos. Generalmente lleva incorporado un agente aglomerante, yeso (sulfato de cálcico semihidratado), para proporcionar firmeza al adsorbente (Figura 10). Su tamaño de poro varía de 20 a 150 Å. Y el tamaño del grano suele ser de 10 a 40 micras (μ) ¹⁹.



Figura 10. Placa de Silicagel.

3.1.1.2.Fase Móvil

Generalmente la fase móvil está formada por una mezcla de solventes orgánicos con agua y algunas otras sustancias adicionales como ácidos, bases, agentes acomplejantes, etc., cuya finalidad es aumentar o disminuir la solubilidad de algunos compuestos. Los eluyentes más utilizados son: éter de petróleo, éter dietílico, ciclohexano, acetato de etilo, cloroformo, diclorometano, etanol, metanol, agua, etc.²⁰.

3.1.2. Cromatografía Líquida de Alto Performance (HPLC)

La Cromatografía Líquida de Alto Performance o HPLC (High Performance Liquid Chromatography en la terminología Inglesa), es un método que permite una gran precisión por la estabilidad que entregan las bombas, estas permiten variar los caudales entre microlitros y varios mililitros, este método entrega una alta precisión en la separación y cuantificación de los analitos que componen una muestra¹⁴.

La cromatografía en columna puede utilizar cualquiera de los tipos de interacciones entre la fase móvil y la fase estacionaria. Hasta hace unos años, la separación se hacía usando flujos gravitatorios como la fuerza impulsadora de la fase móvil, pero requería tiempos de separación muy largos; es por eso que se da la construcción de sistemas impulsores con mucha presión y se obtienen rellenos de las columnas que actúan eficazmente permitiendo tiempos cortos de separación y con una gran selectividad ¹⁹.

Al igual que todos los métodos cromatográficos fundamentalmente la cromatografía líquida de alto performance HPLC es un método separativo; es en la columna donde se produce dicha separación y alrededor de la cual se monta el resto del equipo ¹⁴.

Cuando la muestra y la fase móvil atraviesan la fase estacionaria (columna) ocurre una interacción con cada uno de estos compuestos, interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, interacciones dipolares y electrostáticas de esa forma el componente con mayor afinidad hacia la fase estacionaria (columna) será retenido por mayor tiempo y viceversa ¹⁴.

Las Figura 11 y 12 muestran los componentes básicos de un Cromatógrafo de Alta Resolución:

- Reservorio de la fase móvil.
- Bomba impulsora.
- Inyector.
- Columna.
- Detector.
- Registro.
- Ordenador.

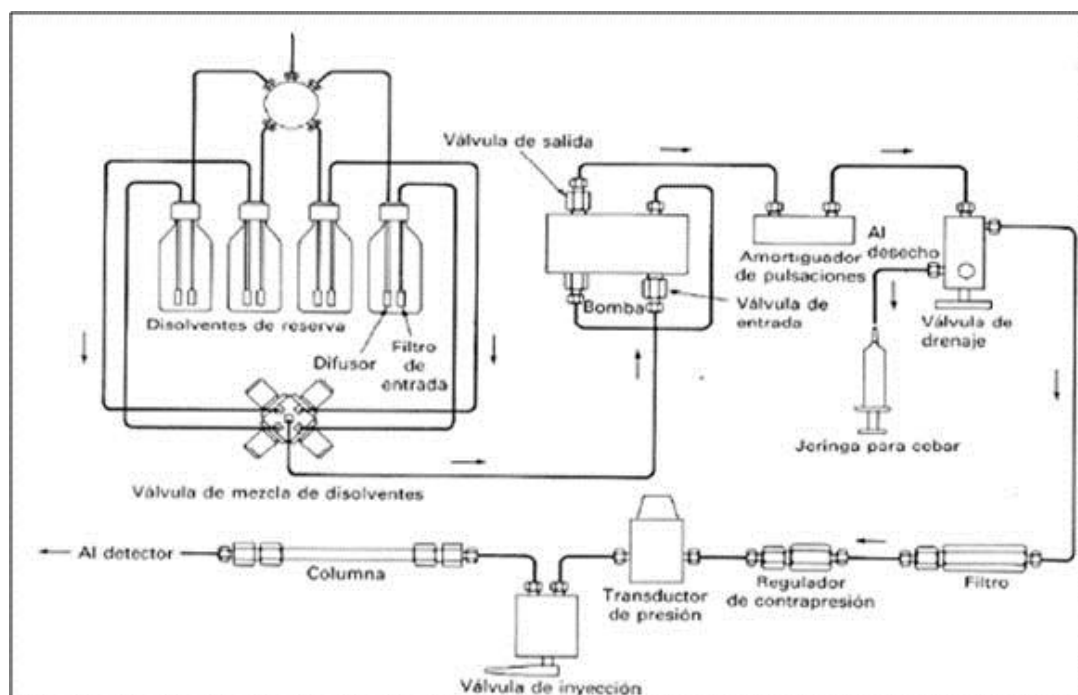


Figura 11. Esquema interno de un equipo HPLC.

3.1.2.1. Partes del Equipo de HPLC

3.1.2.1.1. Bombas Impulsadoras

Los sistemas de bombeo (Figura 13) para impulsar a la fase móvil es uno de los componentes más importantes de un equipo de HPLC. Su principal función es impulsar a la fase móvil hasta el inyector y de ahí hacia la columna. Suelen estar hechas de acero inoxidable, zafiro, rubí y teflón; tienen un caudal de 0.1 y 10 mL/min y presiones de hasta 6000 psi^{14,19}.

Las principales características de un buen sistema de bombeo son: proporcionar presiones de al menos 5×10^7 Pa; no debe haber variaciones cíclicas de la presión, esto afectaría la respuesta del detector; y debe tener una buena capacidad de flujo¹⁹.

Existen varios sistemas de bombeo, las bombas más utilizadas son las de desplazamiento constante de dos pistones de movimiento alternativo¹⁹.

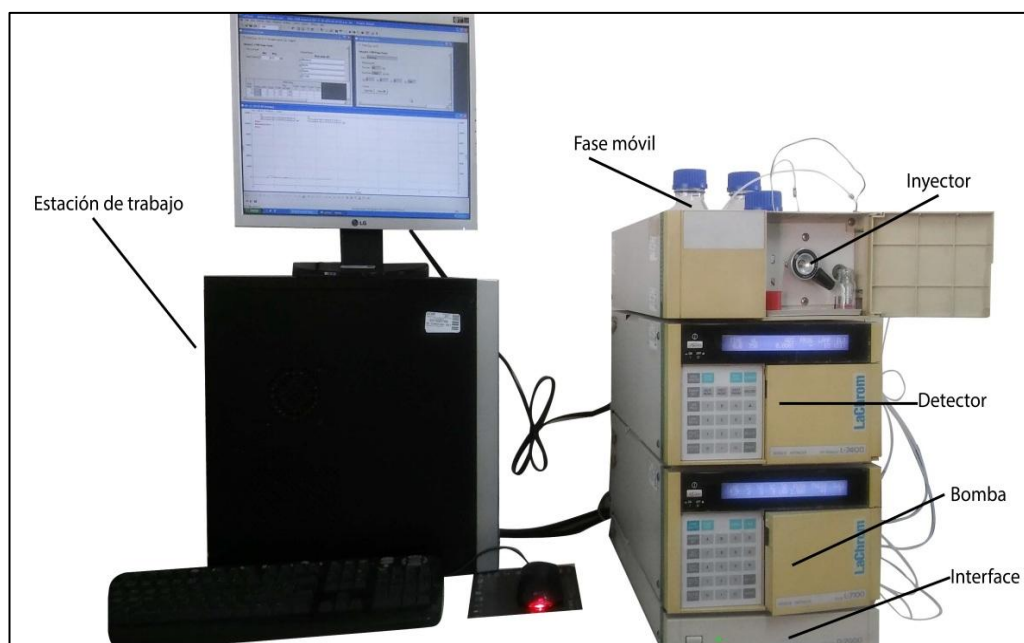


Figura 12. Esquema externo de un equipo HPLC.

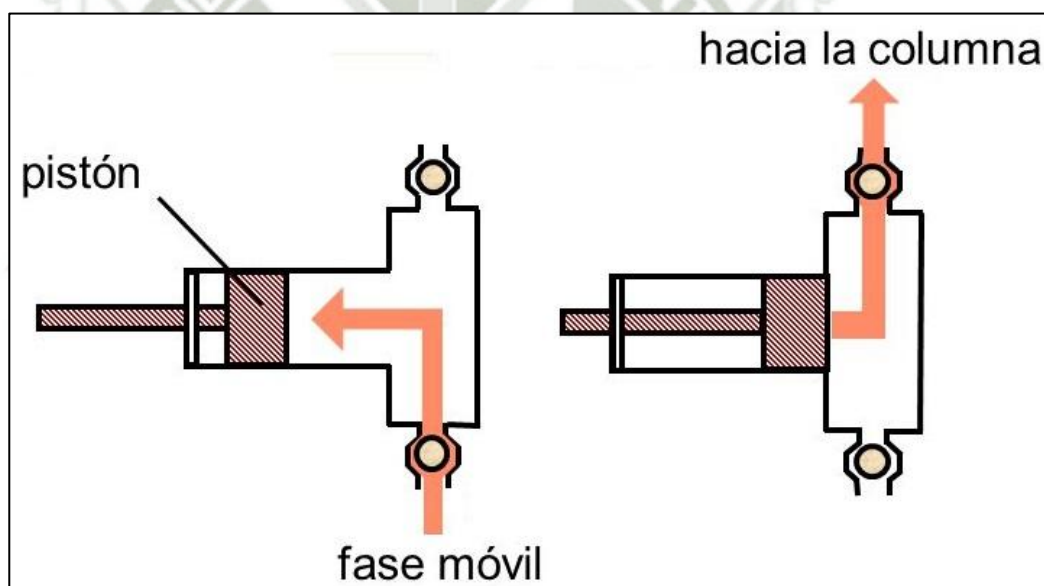


Figura 13. Sistema de Bombeo.

3.1.2.1.2. Tuberías

Las tuberías son las que conectan las distintas partes del HPLC entre sí (Figura 14) por lo que estas deben ser inertes ante solventes y muestras, deben ser resistentes a altas presiones dependiendo de su ubicación en el sistema cromatográfico. Las más utilizadas son las de acero inoxidable y

poliméricas (polipropileno o teflón), las de acero inoxidable son utilizadas para conectar componentes sometidos a alta presión (bomba-inyector; inyector-columna; columna-detector; detector-detector), mientras que las poliméricas se usan donde la presión es atmosférica (solvente-bomba; detector-frasco de desperdicios) ¹⁴.

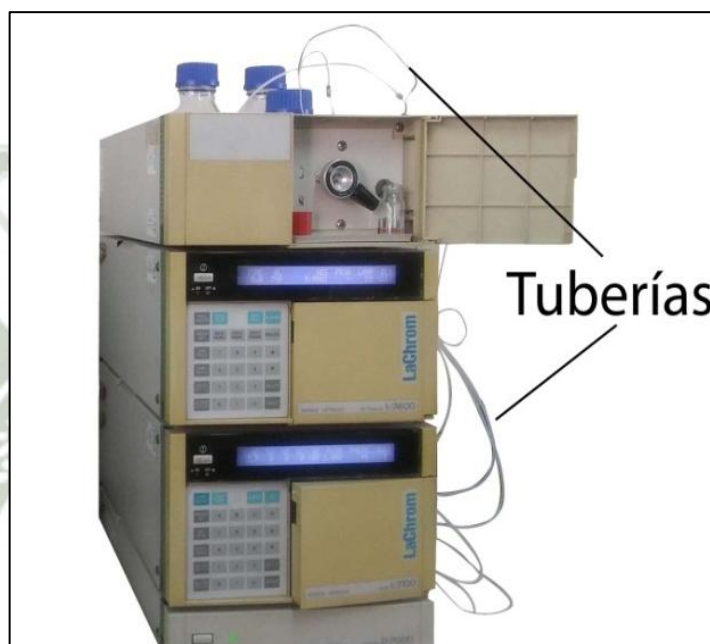


Figura 14. Tuberías del HPLC.

3.1.2.1.3. Uniones

Consiste en 2 piezas de conexión: una **férula** que se afirma a la tubería y un **tornillo** que se ajusta a la unión estas son las llamadas conexiones convencionales y las universales son las que la férula está constituida por un polímero deformable y el tornillo posee una cabeza algo mayor y fresada que permite un ajuste manual ambas deben tener las característica de ser inertes ante las fases móviles y muestras, cerrar herméticamente ni producir volúmenes muertos (Figura 15)¹⁴.

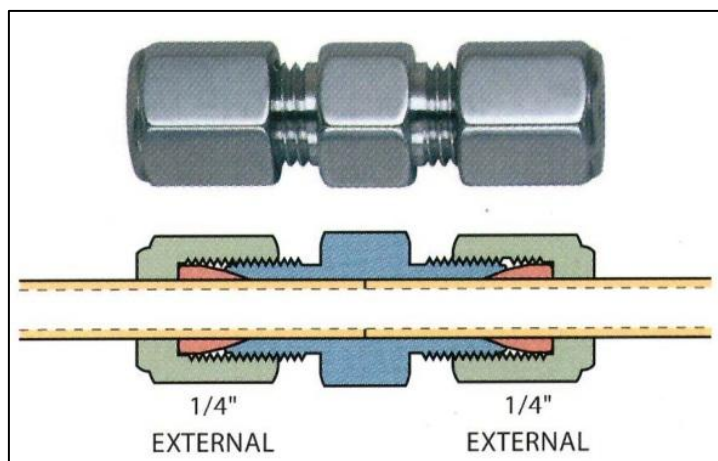


Figura 15. Uniones Externas.

3.1.2.1.4. Sistema de almacenamiento de la fase móvil

Este sistema garantiza el ingreso de la fase móvil al sistema en las condiciones apropiadas, evitando la contaminación y degradación de los disolventes. Estos disolventes se encuentran en un recipiente generalmente de vidrio, estos deben de tener tapones que impidan la contaminación por gases o partículas de suspensión presentes en el aire (Figura 16). Para evitar flujos inestables, la formación de burbujas o la interferencia de partículas extrañas, los disolventes deben de estar previamente filtrados y desgasificados ^{14,19}.

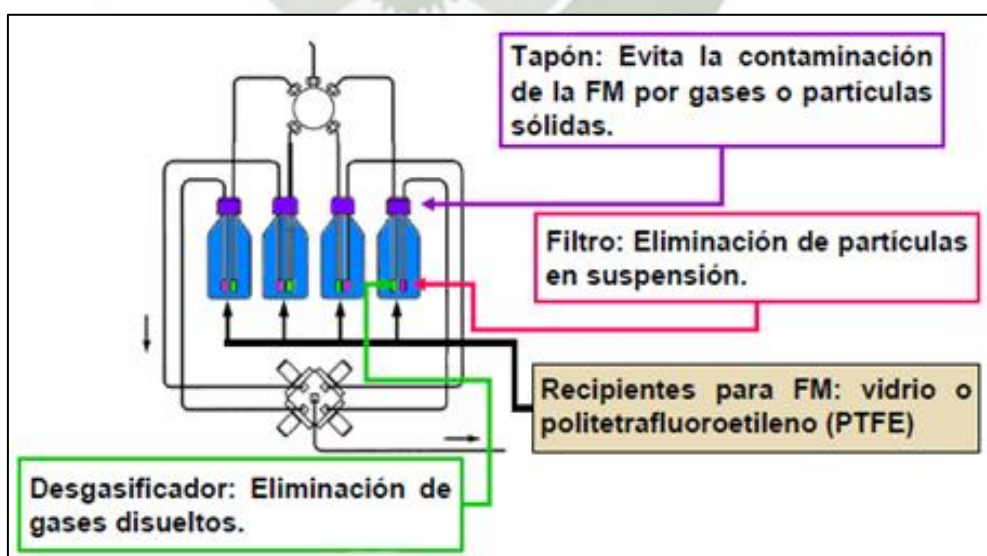


Figura 16. Sistema de almacenamiento de la fase móvil.

3.1.2.1.5. Inyectores

Componente por el cual se introduce la muestra en solución sin interrumpir el caudal, debe ser fácil de operar, químicamente inerte, resistente a altas presiones, y preciso en cuanto a la muestra a introducir. Debido a la presión de trabajo del HPLC se utilizan inyectores de bucle (Figura 17). En la posición de carga, el bucle está aislado de la fase móvil y abierto a la atmósfera. Con una jeringa cuya capacidad es mayor que la del bucle o loop, se coloca la muestra dentro de este (Figura 18); cualquier cantidad que sobre saldrá por la línea de desecho. Tras cargar el loop se gira el inyector a la posición de inyección, la fase móvil se dirige a lo largo del bucle y la muestra es arrastrada hacia la columna.

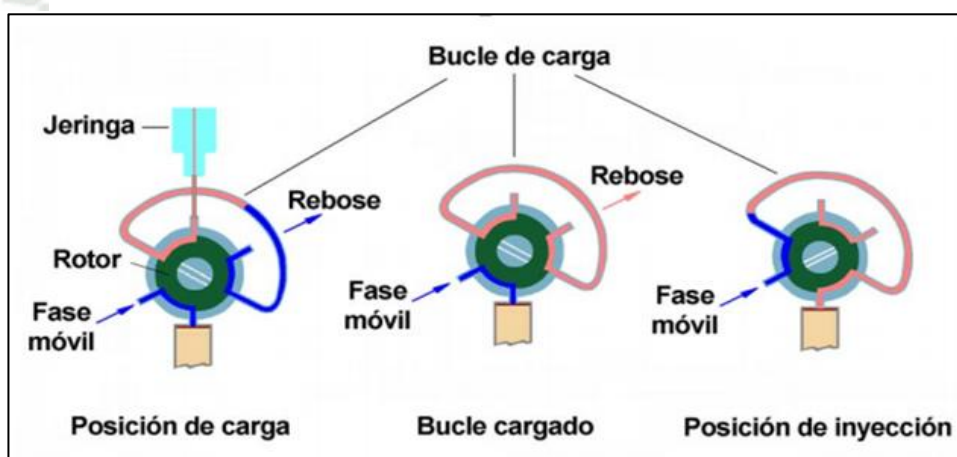


Figura 17. Inyector de bucle.

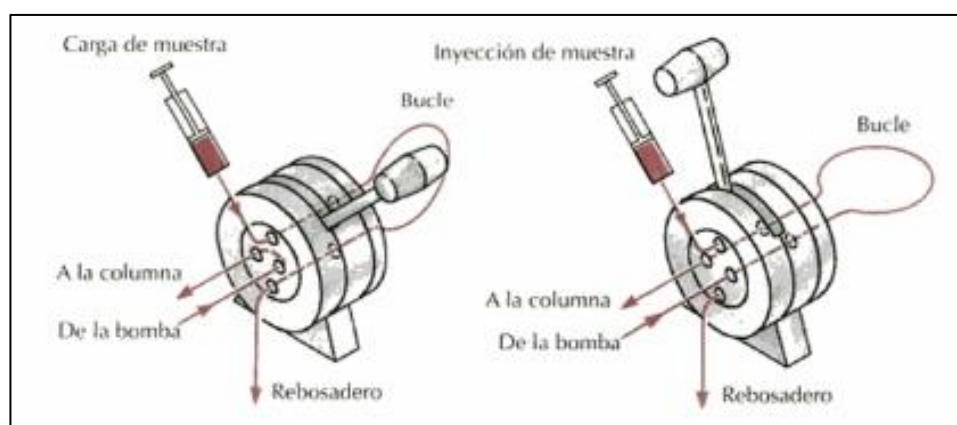


Figura 18. Inyección de la muestra.

3.1.2.1.6. Detectores

Es el componente que permite ver el tiempo, espacio y la posición que ocupan los componentes de una muestra, deben tener ciertas características:

- Tener un amplio rango dinámico de respuestas.
- Poseer una respuesta lineal.
- No contribuir el ensanchamiento de banda.
- Responder a todos los solutos.
- Tener la sensibilidad apropiada.
- No afectarse por cambios de temperatura.
- Poseer una buena relación señal ruido.
- No destruir la muestra.
- Tener una constante de tiempo baja.

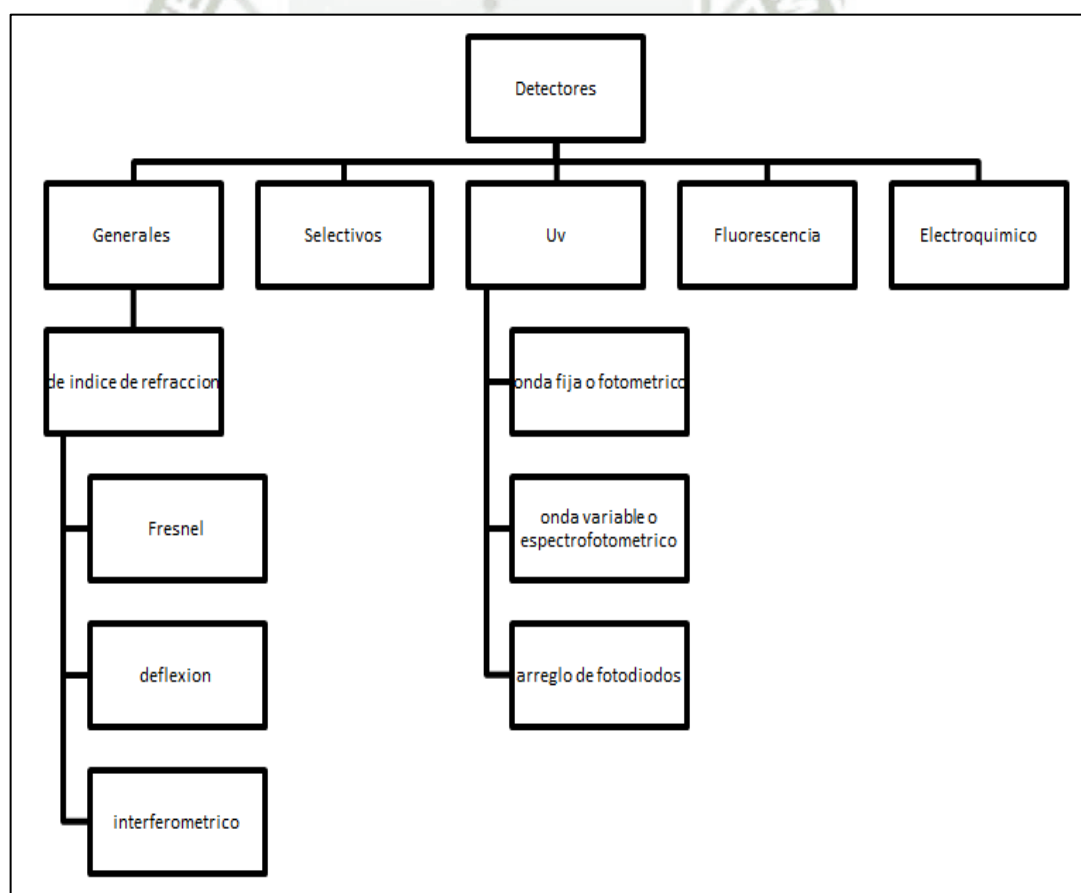


Figura 19. Clases de Detectores.

Pueden clasificarse en detectores **generales** que miden alguna propiedad físicas de la fase móvil, y **selectivos** sensibles a alguna propiedad propia del soluto por ejemplo los detectores UV (Figura 19) ¹⁴.

3.1.2.1.7. Columna

La columna (Figura 20) es un elemento fundamental en la cromatografía de líquidos, es en este lugar donde ocurre la separación cromatográfica. En cada equipo suele haber dos tipos de columnas: una analítica en donde ocurre la separación y una precolumna que se coloca delante para proteger de la contaminación. Las principales columnas que se usan en HPLC son de acero inoxidable y tienen un diámetro interno de entre 0,3 y 5 mm, y una longitud de entre 5 y 25 cm. Estas columnas están rellenas con partículas de sílice porosas de entre 3 a 10 μm , con una forma irregular o esférica. También se emplean microcolumnas construídas con capilares de sílice fundidos, con diámetros internos de 0,1 a 0,5 mm y longitudes de hasta varios metros. La precolumna normalmente tiene el mismo material de relleno y la misma fase estacionaria que la columna analítica, pero es muchos más corta y barata, se cambia con más frecuencia

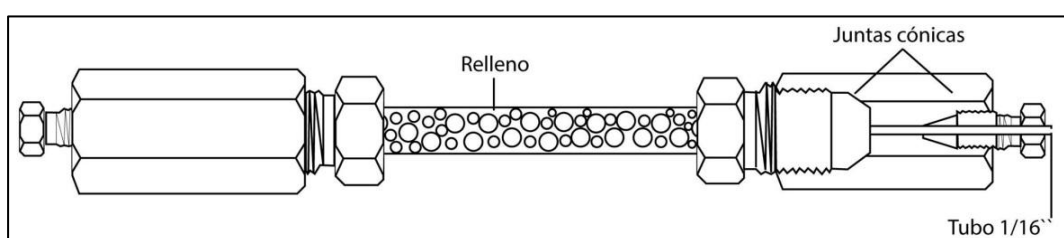


Figura 20. Columna Analítica.

Hay varios tipos de columnas (Figura 22), entre las más usadas tenemos:

- **Columnas de Relleno:** Las más utilizadas hoy en día, éstas son un tubo usualmente de acero relleno de fase estacionaria adecuada al

tipo de separación que se requiera van de un diámetro de entre 2 a 60 mm y una longitud de 5 a 30 cm ¹⁴.

- **Columnas Microbore:** Columnas de pequeño diámetro que van de los 2 a 0.5 mm con longitudes entre 25 y 100cm, estas columnas reducen el consumo de disolventes ¹⁴.



Figura 21. Tipos de columnas.

- **Columnas de Tubo de Sílice:** Se empieza a utilizar la cromatografía de líquidos capilar donde se usa como columna tubos de sílice fundida que van de un diámetro interno de 200 a 500μm de una longitud de varios metros ¹⁴.

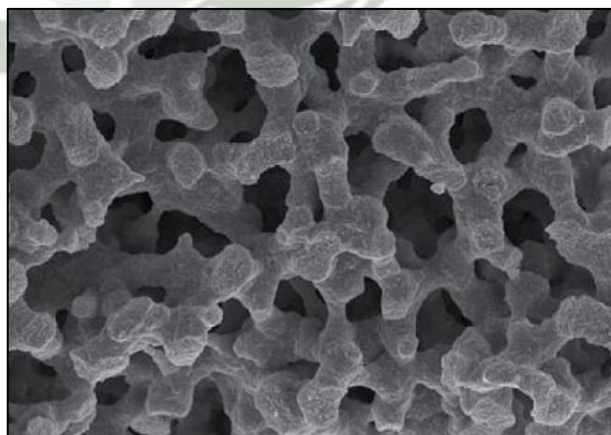


Figura 22: Imagen de la estructura porosa de una columna monolítica de sílice.

- **Columnas Monolíticas:** Consisten en una pieza de un material poroso continuo y herméticamente sellado contra la pared de un tubo o capilar, de manera que la fase móvil esté obligada a pasar a través de toda la columna sin que haya ningún tipo de espacio libre. El material poroso se caracteriza por una distribución de tamaño de poros bimodal; el tamaño más largo de esta distribución corresponde a los macroporos (Figura 23); estos poros se encuentran interconectados formando canales a través del cual fluye la fase móvil, el tamaño de estos canales controla la permeabilidad de la columna, por lo tanto la presión debe ser bombeada para mantenerla a una misma velocidad de flujo. Contienen una varilla de sílice porosa; permite flujos altos por su alta porosidad; tiene mayor fiabilidad, reproducibilidad y duración³⁶. Se dividen en dos tipos:
 - **Columnas Monolíticas Poliméricas:** Consiste en la obtención de polímeros orgánicos mediante polimerización in-situ de los monómeros orgánicos adecuados.
 - **Columnas Monolíticas de base de Sílice:** Preparadas a partir de un proceso de sol-gel dentro de la columna, en el que se produce la hidrólisis de un compuesto de tipo silano o de una mezcla de estos (tetralcoxilanos, tetrametoxisilanos, metiltrimetoxisilanos, etc.) en presencia de un compuesto inerte (poli etilenglicol u otros disolventes) que se denomina porógeno. Se caracterizan por presentar mayores porosidades que las columnas de partículas empaquetadas, con una mayor eficacia, mayor permeabilidad, y permiten trabajar a mayores flujos de fase móvil. Algunas desventajas son que una mayor porosidad implica que hay una menor cantidad de fase estacionaria, esto significa que hay menores factores de retención en los analitos y una disminución en su capacidad de separación. Se requiere práctica si se pretende obtener una buena reproducibilidad

columna a columna. Para este objetivo las etapas más importantes son las de lavado. En algunos casos hay que realizar etapas de lavado de varios días, lo que alarga el tiempo de preparación de la columna pero mejora sus propiedades ³⁶.

3.1.2.1.8. Sistema de toma y procesamiento de datos

El registro de datos se obtiene a partir de señales que provienen del detector por medio de un sistema de toma y procesamiento de datos, estos son:

- **Registrador Gráfico:** Convierte la señal en un gráfico tipo X-Y.
- **Integrador:** Permite obtener un cromatograma (registro gráfico), además también el cálculo de sus concentraciones.
- **Computadora:** Generalmente el integrador es una computadora que tiene un software adecuado para el registro gráfico del cromatograma, como los cálculos apropiados, la manipulación de datos, generación de reportes, almacenamiento de datos, hasta el manejo global de varios cromatogramas ¹⁴.

3.1.2.2. Fase Móvil

Pasa a través de la columna a una velocidad determinada y es la que transporta la muestra, es la encargada de realizar una buena separación y la que permite una mayor variación.

Son utilizados disolventes orgánicos de polaridad media o baja, los solventes utilizados son de un alto grado de pureza, es muy recurrente que se utiliza dos o más disolventes de distintas polaridades, al de mayor polaridad se le da el nombre de modificador y suele ir en pequeñas proporciones, de esa forma es posible obtener una gran variedad de polaridades permitiendo aumentar la selectividad del sistema cromatográfico. Se debe prestar atención a la miscibilidad de un disolvente

con el otro, de no ser así se separarán en dos fases dando resultados erróneos ¹⁴.

4. MÉTODO ANALÍTICO

El método analítico es todo lo que se va a realizar en el análisis, debe describir detalladamente todos los pasos a seguir como la preparación de la muestra, preparación de los estándares, uso de todos los equipos e instrumentos, obtención de la curva de calibración, la formulación de los cálculos, la interpretación de datos, entre otros ¹⁴. Hay tres fases que se deben de seguir para desarrollar un método analítico:

- Definición de las características y requerimientos del método analítico.
- Puesta a punto del método analítico.
- Validación del método analítico.

4.1. VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO

La validación es la verificación de determinados parámetros que permitan asegurar la reproducibilidad y fiabilidad de un determinado proceso, metodología o equipo usados en la elaboración y control de un medicamento; y así poder confirmar y documentar que el método sea idóneo y los resultados sean confiables ^{14,15}.

La validación se debe realizar de forma metódica, ordenada, trazable y confiable. Antes de realizar una validación se debe de conocer el método a validar, es decir, el analito, la concentración y la matriz a utilizar. Según el requisito 5.4.5.2 de la Norma NTP ISO/IEC 17025 de 1999, todo laboratorio debe validar:

- Métodos no normalizados: que son desarrollados en el laboratorio o son métodos nuevos publicados en alguna revista o libro.
- Métodos normalizados con una modificación significativa.

- Cuando se requiera demostrar la equivalencia entre dos métodos de ensayo.

De acuerdo a los métodos a validar, esta se puede dividir en:

- **Validación Retrospectiva:** Se pueden combinar nuevos criterios de validación con toda la experiencia ya adquirida.
- **Validación Prospectiva:** Se realiza frente a un nuevo producto ¹⁴.

Todos los métodos analíticos deben de validarse para cumplir con las exigencias legales de la Good Manufacturing Practice de los Estados Unidos que indican que se debe establecer y documentar la exactitud, sensibilidad, especificidad y reproducibilidad de los métodos usados ¹⁴.

4.2. PARÁMETROS ANALÍTICOS

En todo ensayo de validación analítica se deben considerar los siguientes parámetros analíticos:

4.2.1. Selectividad o Especificidad

La selectividad o especificidad es la propiedad del método para producir una señal y determinar la presencia de un analito en particular, sin interferencias de otros componentes de la matriz de la muestra, como excipientes, productos de degradación, subproductos, metabolitos del mismo analito, etc. ^{14,15}.

4.2.2. Linealidad

La linealidad de un método analítico es la proporcionalidad entre la concentración de un analito y su respectiva respuesta. Con el fin de determinar el rango lineal se realiza un gráfico de concentración versus respuesta; después de establecer el comportamiento lineal del método se realiza la curva de calibración.

Para su determinación se preparan una serie de por lo menos cinco diluciones de un estándar, se inyectarán por duplicado para obtener la curva de regresión $Y=bX+a$, posteriormente se deberá graficar ¹⁴.

4.2.3. Precisión

La precisión expresa el grado de concordancia de los resultados cuando el método es aplicado repetidamente a varias muestras de una mezcla homogénea. Generalmente es expresada como la desviación estándar; y puede ser medida por el grado de reproducibilidad o de repetibilidad de un método analítico ^{14,16}.

4.2.4. Exactitud

La exactitud, también conocida como error sistemático o tendencia corresponde a la diferencia entre el valor obtenido (media) y el valor verdadero. La exactitud debe ser reportada como porcentaje de recuperación de una cantidad conocida de analito agregada a la muestra ^{14,16}.

4.2.5. Sensibilidad

La sensibilidad de un método analítico es la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo. Los parámetros a ser definidos al evaluar la sensibilidad son ¹⁴:

- **Límites de Detección:** Según la USP XXII es la menor concentración de analito que puede detectarse; pero no necesariamente cuantificarse; se expresa en unidades de concentración (% , ppm, ppb, etc.). Estos límites fundamentan que cantidad de analito está por encima o por debajo de un nivel de seguridad ^{14,16}.
- **Límites de Cuantificación:** Según la misma referencia anterior es la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud, expresada también en unidades de concentración. Es una característica de las valoraciones cuantitativas de compuestos que se

encuentran en bajas concentraciones en la matriz de la muestra, como impurezas o productos de degradación en materias primas o productos farmacéuticos ^{14,16}.





CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MUESTRA

Para el presente trabajo primero se usaron diversas muestras de diferentes matrices como bebidas y golosinas, que presentaran un color rojo oscuro, ellas se valoraron por Cromatografía en Capa Fina, con el fin de seleccionar las muestras que presenten el colorante Amaranto.

En este estudio encontramos la presencia del colorante en las bebidas carbonatadas, siendo estas las bebidas a elección; se tomaron cinco muestras de diversas marcas, obtenidas de diversos supermercados y tiendas de la ciudad de Arequipa.

De estas muestras solo dos contenían colorante Amaranto, es por eso que de estas dos marcas de bebidas se tomaron tres muestras de tres lotes distintos (Tabla 3), para poder realizar la validación del método y hallar el contenido exacto de colorante de cada marca.

Tabla 3. Muestras de Bebidas Carbonatadas.

Muestras	Lotes	N° de muestras
Bebida A	2N2010917158	3 muestras
	2N2020917398	
	2N2010917468	
Bebida B	352060911258	3 muestras
	262040910938	
	362050910108	

Fuente: Elaboración propia

2. LUGAR DE INVESTIGACIÓN

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el pabellón H-202 Laboratorio de Investigación “Proyecto Mercurio” en las instalaciones de la Universidad Católica de Santa María en la ciudad de Arequipa.

3. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

3.1 MATERIALES:

- Micropipetas de 50 y 1000 μ L.
- Fiolas de 5, 10, 100 y 250 mL.
- Pipetas volumétricas de 5, 10 y 25 mL.
- Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 mL.
- Tubos Capilares.
- Funnel de pesada.
- Probetas graduadas de 100 mL.
- Vasos de precipitado de 25, 50 y 100 mL.
- Baguetas.
- Espátulas.
- Jeringas descartables de 1 mL.
- Puntas estériles.
- Membrana de filtración para HPLC (0.5 micras).
- Matraz Erlenmeyer de 100 mL.
- Matraz Kitasato de 1000 mL boca H29/32.
- Soporte de membrana con placa porosa H29/32.
- Embudo soporte de 300 mL.
- Pinza.
- Placas de Silicagel 60 F254.

3.2 REACTIVOS:

- Agua destilada.
- Agua ultra pura.
- N-Propanol (Merck®).
- Hidróxido de Amonio (Merck®).
- Acetonitrilo grado HPLC (JT Baker).
- Metanol grado HPLC (Merck®).

- Bromuro de Cetiltrimetilamonio - CTAB (Merck®).
- Estándar de Amaranto con pureza ≥ 98 % (Sigma-Aldrich).

3.3 EQUIPOS:

Para la presente investigación se utilizaron equipos debidamente calibrados y verificados:

a) Equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución

Marca :	Merck Hitachi
Modelo:	LaChrom
Detector:	UV-vis
Modelo:	L-7400
Columna:	Chromolith RP 18e 100 x 4 mm
Integrador:	Merck Hitachi
Bomba programable:	Merck Hitachi
Modelo:	L-2130
Nº Serie:	17E01-036
Interface:	Merck Hitachi
Modelo:	D-7000
Software:	EZ Chrom Elite

b) Balanza analítica

Marca:	OHAUS
Modelo:	PIONNER
Sensibilidad:	0.0001 g

c) Ultrasonido

Marca:	BRANSON
Modelo:	2510

d) Purificador de agua:

Marca:	Merck
--------	-------

Modelo: Sistema de purificación de agua Simplicity UV.

Resistividad a 25 °C: 18,2 MΩ•cm

4. MÉTODOS

4.1 CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (TLC)

4.1.1 Preparación de la placa

Se cortó la placa de Silicagel por la parte de atrás con la ayuda de una cuchilla y una regla, teniendo cuidado de no tocar la parte del Silicagel con las manos para evitar la contaminación; después se trazó una línea recta paralela a uno de los bordes a una distancia de 1 cm, sobre esta línea se dibujó 6 puntos equidistantes entre si y entre los bordes, se sembró el estándar y las cinco muestras elegidas.

4.1.2 Preparación del estándar de Amaranto

Se preparó la solución estándar pesando 2 mg de estándar de Amaranto (Sigma-Aldrich) al 98% de pureza y se transfirió a una fiola de 5 mL completando a volumen con agua ultrapura para lograr una concentración de 400 mg de amaranto por litro de solución



Figura 23. Preparación de la solución estándar.

4.1.3 Preparación del Estándar a varias concentraciones

Del estándar a 400 mg/L, se preparó soluciones a concentraciones de 6.4, 9.6, 12.8, 16 y 20.8 mg/L, para el análisis semicuantitativo.

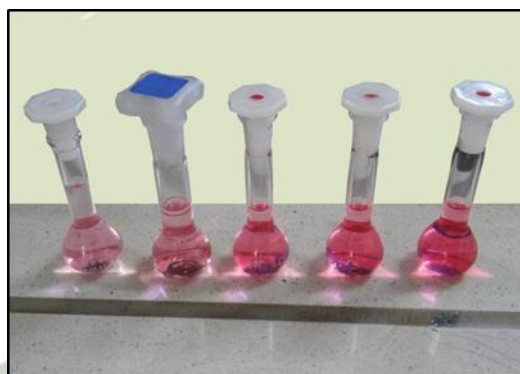


Figura 24. Preparación de soluciones a varias concentraciones.

4.1.4 Preparación de las muestras

Se tomó las 5 marcas de bebidas carbonatadas escogidas y se procedió a colocar en fiolas, se desgasificó y se sembró en la placa de Silicagel.

4.1.5 Siembra del Estándar y de las Muestras

La siembra del estándar se realizó depositando 10 μ L en el borde inferior de la placa, en los puntos equidistantes realizados en la placa de Silicagel, con un capilar de vidrio. La siembra se realizó de forma cuidadosa con el fin de no deteriorar la superficie del adsorbente. De la misma forma se procedió también con la siembra de las muestras.

4.1.6 Preparación de la fase móvil

Para la fase móvil se usó Hidróxido de Amonio y n-Propanol (40:60), esta solución se introdujo en una cámara herméticamente cerrada.

4.1.7 Corrida de la placa cromatográfica

Se introdujo la placa en la cámara cerrada saturada con los vapores del disolvente (fase móvil) con el que se llevó a cabo el desarrollo. El disolvente no debe estar en contacto directo con la muestra depositada en la placa cromatográfica, debiendo quedar su nivel por debajo de la línea de aplicación de muestras.

La placa se extrajo de la cámara cuando el frente del disolvente estuvo aproximadamente a 1 cm de su borde superior.



Figura 25. Corrida de la Placa Cromatográfica.

4.1.8 Lectura de la Placa Cromatográfica

Se marcó el borde superior de la placa después de la corrida para poder hallar el R_f de cada placa, se dejó secar por unos minutos, se midió con la ayuda de una regla para hallar el R_f , se escaneó y se realizó el análisis semicuantitativo mediante el Software ImageJ.

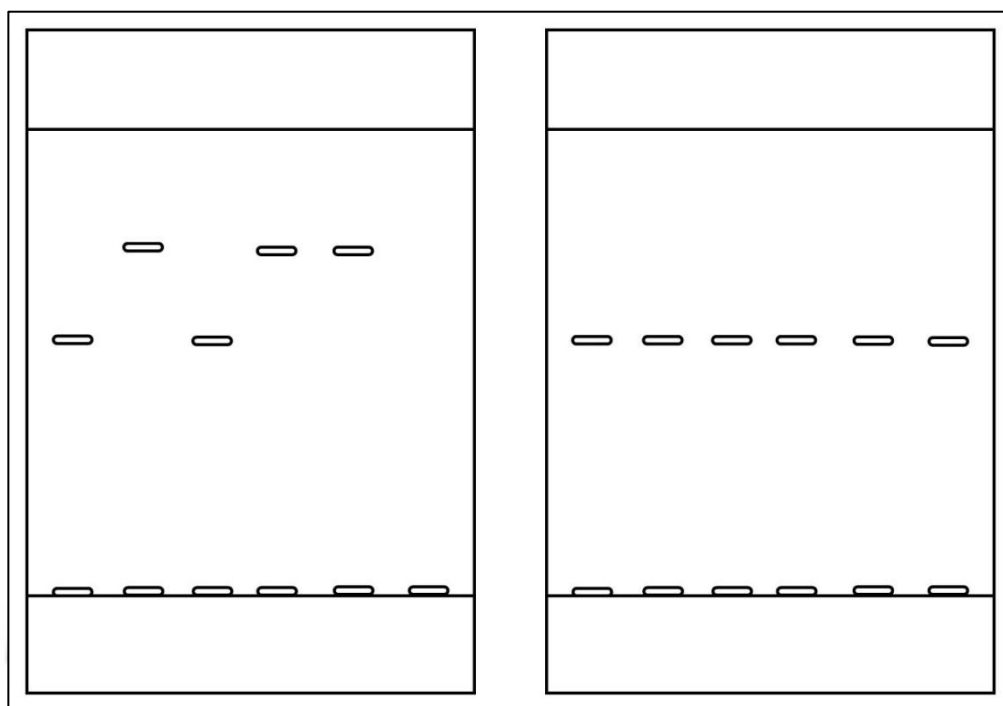


Figura 26. Placas Cromatográficas.

4.2 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Determinación del Colorante Amaranto (E-123) por Cromatografía Líquida de Alta Resolución

Para la identificación de los tiempos de retención del colorante Amaranto se usó un estándar Sigma Aldrich con una pureza mayor 98 % usando un HPLC-UV Vis, columna Chromolith RP 18e 100 x 4 mm, una fase móvil de Acetonitrilo: Bromuro de Cetiltrimetilamonio (50:50), un flujo de 2 mL/min a 350 nm.

Método Analítico para determinar el contenido del colorante Amaranto (E-123) en muestras de bebidas carbonatadas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

Se tomó un grupo de muestras de bebidas carbonatadas de color rojo para la determinación del colorante Amaranto, teniendo en consideración que

todas las bebidas se encuentran bajo las mismas condiciones de almacenamiento y son procesadas de la misma forma.

4.2.1 Condiciones Cromatográficas

- **Equipo:** Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución.
- **Columna:** Chromolith RP-18e de 100 - 4.6 mm.
- **Sistema:** Isocrático.
- **Longitud de Onda:** 350 nm (Detector UV/Vis).
- **Flujo:** 2 mL/min.
- **Tiempo de retención:** 3.5 min.
- **Tiempo total de corrida:** 10 minutos.
- **Fase Móvil:** Acetonitrilo: CTAB (50:50).

4.2.2 Preparación de la Fase Móvil

En una balanza analítica se pesó 0.45g de CTAB (Bromuro de Cetiltrimetilamonio), se colocó en una fiola de 250 mL y enrasó con agua ultrapura, teniendo cuidado de no generar espuma, se agregó 150 mL de Acetonitrilo grado HPLC, en seguida se filtró en un sistema de filtración al vacío, después se transfirió a un frasco de vidrio herméticamente cerrado para realizar las corridas en el HPLC.

Se procedió a filtrar el Acetonitrilo grado HPLC en el mismo sistema de filtración al vacío y se colocó en otro frasco de vidrio.

4.2.3 Preparación de la Solución Stock de Estándar de Amaranto (E-123)

Para preparar la solución stock se pesó 3 mg de estándar de Amaranto 98% de pureza y se transfirió a una fiola de 5 mL completada a volumen con agua ultrapura para lograr una concentración stock de 600 mg/L.

4.2.4 Validación del Método Analítico

De acuerdo a la International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH); la association of analytical communities AOAC; la USP (Tabla 4) y la Norma Técnica Peruana ISO/IEC 17025 se analizaron los siguientes parámetros:

- Linealidad
- Sensibilidad
- Precisión
- Exactitud
- Selectividad

Tabla 4 Parámetros de validación según la USP

Características	Ensayos cuantitativos		Ensayos de límite	*Disolución (solo medición) *Contenido/potencia
Exactitud	-	+	-	+
Repetibilidad	-	+	-	+
Precisión intermedia	-	+	-	+
Especificidad	+	+	+	+
Límite de detección	-	-	+	-
Límite de cuantificación	-	+	-	-
Linealidad	-	+	-	+
Intervalo	-	+	-	+

Fuente : Elaboración propia según USP

4.2.4.1. Linealidad

La linealidad sirve para hallar la proporcionalidad entre la concentración de un analito y su respectiva respuesta.

4.2.4.1.1. Preparación de la curva de calibración

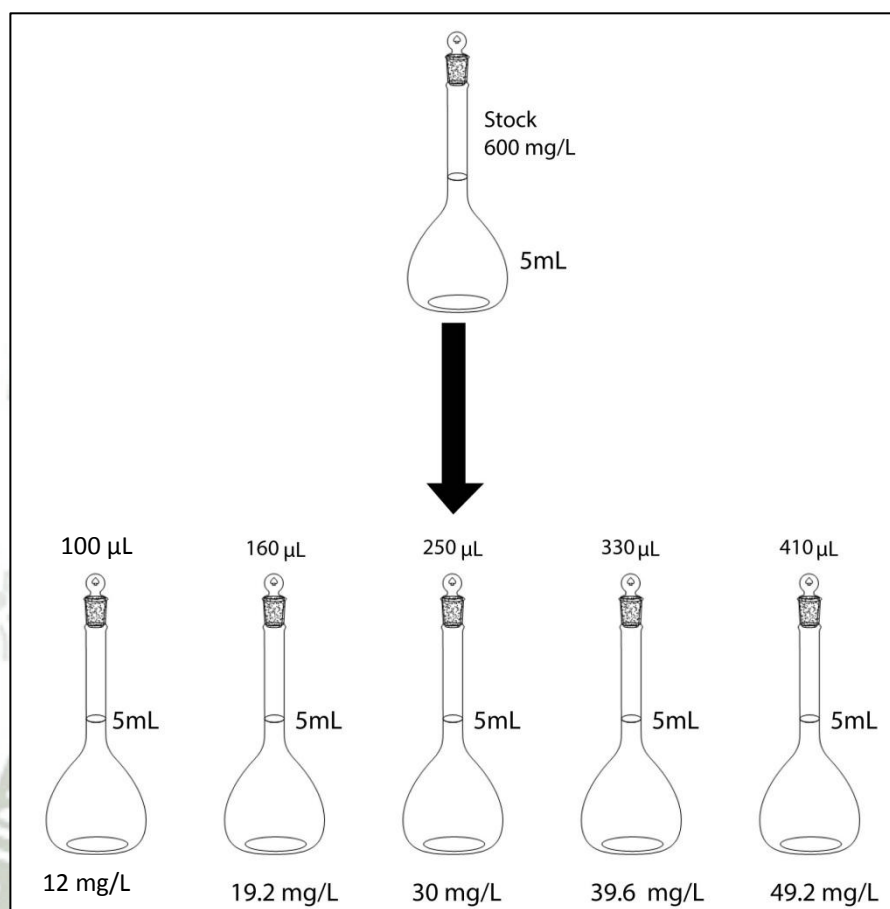


Figura 27. Preparación de la curva de calibración.

Se preparó una solución stock con el estándar de Amaranto a una concentración de 600 mg/L con agua ultrapura hasta su completa disolución. A partir de esta solución se tomaron alícuotas de 80, 160, 250, 330 y 410 µL, llevando cada una de ellas a fioles de 5 mL, enrasándolas con agua ultrapura, obteniendo concentraciones de 9.6, 19.2, 30, 39.6 y 49.2 mg/L respectivamente. Se pasó por filtros Anotop y se procedió a inyectar por triplicado.

4.2.4.1.2. Análisis Estadístico

La linealidad de un método analítico es la proporcionalidad entre la concentración de un analito y su respectiva respuesta. Siendo este paso muy necesario. Además se determinó el rango lineal, es decir, el intervalo que hay entre la concentración mínima y la concentración máxima de analito para el cual ha sido aprobado el método, se efectuó también el dosaje por interpolación en una curva de calibración determinando la ecuación de regresión lineal $Y=bX+a$.

$$b = \frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum X_i \sum Y_i}{n}}{\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}}$$
$$a = \frac{\sum Y_i - b \sum X_i}{n}$$

Siendo a y b estimadores de la ordenada al origen y pendiente respectivamente, n el número de mediciones, X_i la concentración e Y_i el valor medido en el ensayo i . La no correspondencia de las rectas indica problemas por efecto de matriz y está relacionada con la exactitud del método. Independientemente de la apariencia de la recta, resulta conveniente evaluar los estimadores de regresión en un determinado intervalo de confianza ($p=0.05$).

- **Del coeficiente de regresión lineal (r):** se determina para evaluar el ajuste al modelo lineal propuesto, $Y=bX+a$.
- **De la pendiente (b):** se determina como parámetro indicativo para evaluar la correlación de diferentes métodos.
- **De la ordenada al origen (a):** se determina para evaluar que la recta pase por el origen y que cualquier desviación pueda ser únicamente a un error aleatorio.

Así:

$$r = \frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum X_i \sum Y_i}{n}}{\sqrt{\left(\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}\right) \left(\sum Y_i^2 - \frac{(\sum Y_i)^2}{n}\right)}}$$

El valor de $r=1$ significa que es una recta completamente lineal, $r=-1$ es una recta lineal de pendiente negativa y $r=0$ indica que no hay correlación entre **X** e **Y**. En la práctica, r es generalmente mayor a 0.99 y los valores menores a 0.90 son muy raros. Sin embargo, el mejor indicador para la linealidad no es **r**, sino un test estadístico, en el cual se calcula un valor de t_r con $n-2$ grados de libertad siendo comparado con el valor **t** tabulado para el nivel de confianza requerido.

En este caso la hipótesis nula sería la no correlación entre **X** e **Y**. Si el valor observado de t_r es mayor que **t** de tablas, se rechaza la hipótesis, entonces la correlación lineal será significativa con la probabilidad calculada.

$$t_r = \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

El límite de confianza para **b** se calcula en función de su varianza S_b :

$$S_b = \sqrt{\frac{S^2_{x,y}}{\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}}}$$

$$S^2_{x,y} = \frac{\sum Y_i^2 - a \sum Y_i - b \sum X_i Y_i}{n-2}$$

Luego, los límites de confianza de la pendiente corresponden a:

$$\text{Intervalo de confianza de } b = b \pm t \cdot S_b$$

Por su parte, el límite de confianza de a se calcula en función a su varianza S_a :

$$S_a = \sqrt{S_b^2 \frac{\sum X_i^2}{n}}$$

$$\text{Intervalo de confianza de } a = a \pm t \cdot S_a$$

La International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) recomienda un +/- 20% sobre el rango para pruebas de dilución.

4.2.4.2. Sensibilidad

4.2.4.2.1. Preparación de la solución stock

Se preparó la solución stock pesando 3 mg de estándar de Amaranto al 98% de pureza y se transfirió a una fiola de 5 mL completando el volumen con agua ultrapura para lograr una concentración stock de 600 mg/L.

4.2.4.2.2. Preparación de las diluciones

En Fiolas de 5 mL se transfirió 80, 160, 250, 330 y 410 μ L de la solución stock, y se enraso con agua ultrapura obteniendo concentraciones de 9.6, 19.2, 30, 39.6 y 49.2 mg/L respectivamente. Proceder con la lectura en el HPLC.

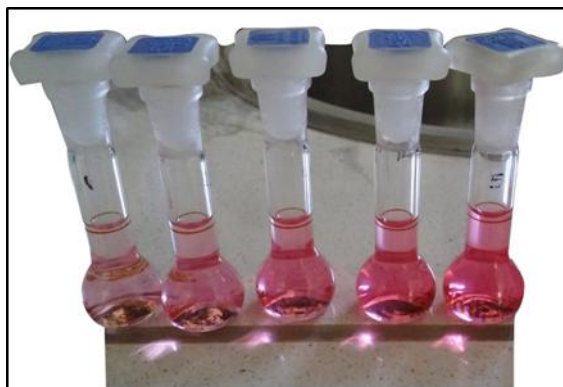


Figura 28. Preparación de las diluciones.

4.2.4.2.3. Análisis Estadístico

La sensibilidad de un método analítico es la mínima cantidad del analito que puede reproducir un resultado significativo.

Los parámetros a definir al evaluar la sensibilidad de un método son:

- Límites de detección: Según la USP XXII, es la menor concentración de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra en las condiciones establecidas. Se expresa en unidades de concentración (% , ppm, ppb, etc.)
- Límites de cuantificación: Según la misma referencia anterior, es la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas. También se expresa en unidades de concentración.

Los límites de detección y cuantificación a su vez pueden ser estimados a partir de la curva de regresión lineal, siempre y cuando se hayan considerado concentraciones bajas del analito, por extrapolación a concentración cero.

Se determina la pendiente de la curva (concentración vs. respuesta) en un rango apropiado.

Se obtiene otra curva de calibración, inyectando cada punto por triplicado, pero a concentraciones menores de analito, determinándose una nueva ecuación de esta recta y se extrapola la respuesta a concentración cero, obteniéndose un estimado de la respuesta de blanco Y_{bl} .

Se determina la desviación estándar correspondiente a cada concentración anterior, se calcula la recta de la concentración vs. S y se extrapola la desviación estándar a concentración cero obteniéndose el estimado S_{bl} correspondiente a la desviación estándar del blanco.

Límite de Detección:

$$LD = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b} \frac{1}{\sqrt{n'}}$$

Límite de cuantificación:

$$LC = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b} \frac{1}{\sqrt{n'}}$$

4.2.4.3. Precisión

La precisión expresa el grado de concordancia de los resultados cuando el método es aplicado repetidamente a varias muestras de una mezcla homogénea. Generalmente es expresada como la desviación estándar; y puede ser medida por el grado de reproducibilidad o de repetibilidad de un método analítico.

4.2.4.3.1. Preparación del ensayo

En 6 fiolas de 5 mL se transfirió la muestra de bebidas carbonatadas y enraso, para someter al ultrasonido por 10 minutos, luego se filtró y procedió a leer por HPLC.

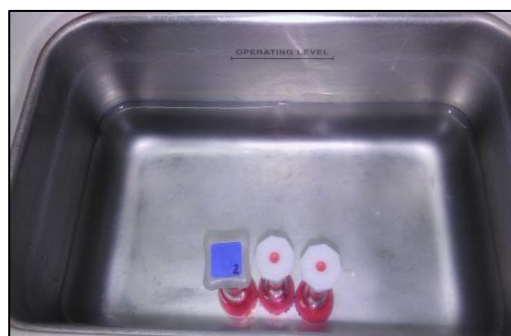


Figura 29. Someter a ultrasonido y filtrar.

4.2.4.3.2. Análisis estadístico

La precisión está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio o central y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea.

Esta se expresa matemáticamente como desviación estándar simbolizada como σ , estimada analíticamente por s , o comúnmente como desviación estándar relativa (DSR) o coeficiente de variación (CV).

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

Donde n es el número de medidas, X_i es el valor medido en el ensayo i y \bar{X} el estimador de la media poblacional μ , calculado:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

La desviación estándar relativa (DSR) o coeficiente de variación (CV) se calcula como:

$$DSR = \frac{S \cdot 100}{\bar{X}}$$

La desviación estándar y la desviación estándar relativa permite evaluar la incertidumbre en la estimación de la medida (error aleatorio que corresponde a la dispersión de datos alrededor de la media).

La precisión de un método analítico deberá estudiarse sobre:

- **El sistema:** Evaluando la dispersión de por lo menos 6 inyecciones del estándar.
- **El método:** Evaluando la dispersión de varias preparaciones de la muestra final homogénea. La evaluación es de todo el procedimiento, desde la preparación de la muestra, hasta la medición en el HPLC.

La precisión debe medirse en condiciones repetitivas (mismo analista, mismo día y mismo instrumento) y en condiciones reproducibles (diferente día, diferente analista y diferente instrumento).

El coeficiente de repetibilidad y de reproducibilidad es un parámetro muy útil para evaluar la precisión de un método analítico. Según la Association of Analytical Communities (AOAC) su valor está comprendido entre 1.5 y 2. Así, la USP indica en general una DSR de no más de 2 %, inyectando 5 veces la solución estándar, aunque en condiciones apropiadas puede obtenerse valores menores al 1 %.

Horwitz ha encontrado una ecuación que relaciona la DSR de un método con la concentración del analito de la muestra. Para esto, se recopilaron los resultados de 150 ensayos de la AOAC comprendiendo cinco metodologías diferentes (cromatografía, absorción atómica, espectrofotometría, bioensayos), la relación hallada fue:

$$DSR (\%) = 2^{(1-0.5\log C)}$$

Donde C es la concentración del analito expresada en potencias de 10.

Horwitz también reportó que la DSR entre laboratorios tiende a disminuir al aumentar la experiencia analítica hasta un valor mínimo que se aproxima al estimado por el cálculo.

4.2.4.3.2.1. Límites de confianza

En muchos casos se debe de indicar el intervalo de confianza de la medida, es decir el rango en el cual puede definirse la probabilidad de que esta “capture” con la probabilidad indicada el parámetro μ .

Pueden ser varios criterios, pero se deberá dar constancia del criterio empleado; la media ± 2 desviaciones estándar (correspondiente al 95 % de las medidas en una distribución normal), la media ± 3 desviaciones estándar (99,7 % de las medidas para el mismo tipo de distribución). Preferentemente cuando el número de muestras es pequeño (menor a 30), las medidas independientes y la distribución normal pueden calcularse de acuerdo a la distribución t de Student según:

$$\bar{X} - \frac{t_{v,\alpha} \cdot S}{\sqrt{n}} < \mu < \bar{X} + \frac{t_{v,\alpha} \cdot S}{\sqrt{n}}$$

Donde $t_{v,\alpha}$ es el valor “t de Student” tabulado para n mediciones con $v = n - 1$ grados de libertad y para varios niveles de α de significación.

4.2.4.4. Exactitud

La exactitud, también conocida como error sistemático o tendencia corresponde a la diferencia entre el valor obtenido (media) y el valor

verdadero. La exactitud debe ser reportada como porcentaje de recuperación de una cantidad conocida de analito agregada a la muestra.

4.2.4.4.1. Preparación del ensayo

Se preparó fioles de 5 mL con 160 μ L (19.2 mg/L) de la solución stock de Amaranto y enrazadas con muestra de bebida carbonatada además de un blanco de 5 mL con 160 μ L de agua ultrapura y enrazado con muestra de bebida carbonatada para poder determinar el aproximado de trazas. Someter a ultrasonido por 10 minutos, filtrar y proceder a leer por HPLC.

4.2.4.4.2. Análisis Estadístico

La exactitud, también conocida como error sistemático o tendencia, es la diferencia entre el valor obtenido (media) y el valor verdadero. Matemáticamente suele expresarse:

Desviación: $B = \bar{X} - \hat{X}$

Desviación Relativa: $B\% = \frac{B}{\bar{X}} \cdot 100$

Recuperación: $R = \frac{\bar{X}}{\hat{X}} \cdot 100$

Donde \bar{X} es el valor medio y \hat{X} el valor verdadero. De todas ellas, la más utilizada es la recuperación; si bien el valor verdadero de concentración no se conoce, solo puede estimarse; es posible preparar una muestra por un procedimiento más exacto que el evaluado (por pesada, dilución de peso, etc.) para utilizarla como referencia.

La exactitud también podríamos llamarla “inexactitud”, debe ser lo más pequeña posible, para que el valor medido se aproxime al valor de referencia. La recuperación del analito siempre debe de acercarse al 100 %.

En los análisis de trazas (microcomponentes) no siempre se alcanzan recuperaciones tan elevadas, se consideran valores de entre el 60 y 80 %. En el análisis de macrocomponentes, se requiere que el valor modificado no difiera del aceptado como referencia. Para determinarlo se puede realizar un ensayo de t de Student, efectuando varias determinaciones de la muestra de concentraciones conocidas y calculando el t experimental (t_{ob}), que se compara con t de tablas para n-1 grados de libertad en el nivel de confianza escogido que es generalmente $p=0.05$. El valor de t_{ob} puede calcularse:

$$t_{ob} = \frac{[\hat{X} - \bar{X}]}{S \sqrt{n}}$$

Si t_{ob} resulta menor que el valor tabulado, el método tiene la exactitud requerida para ese ámbito de confianza. Si t_{ob} resulta mayor que el valor tabulado, el método tiene un error sistemático, del signo resultante, para ese ámbito de confianza.



CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA SEMICUANTITATIVA (THIN LAYER CHROMATOGRAPHY, TLC)

Se realizó un análisis semicuantitativo de la cromatografía en capa fina “TLC” mediante el software ImageJ.

Para el desarrollo del presente trabajo fue necesario relizar un ensayo de cromatografía en capa fina, para la identificación del colorante amaranto en muestras de diversas matrices. Razón por la cual se usó un estandar de amaranto con una pureza al 98 % Sigma Aldrich, disuelto en agua ultra pura, una fase móvil n-propanol:hidróxido de amonio (3:2) para determinar el factor de retención (R_f) correspondiente. En la Figura 30 se observa la mancha correspondiente a amaranto con un R_f de 0.52.



Figura 30. Placa de Cromatografía en Capa Fina de estandar de Amaranto.

Asimismo se preparó una placa para una determinación semicuantitativa de amaranto, usando concentraciones de 6.40, 9.60, 12.80, 16.00 y 20.80 mg/L, las cuales fueron sembradas en una placa de silica gel, los resultados de observan en la Figura 31 siendo las cinco del lado izquierdo.

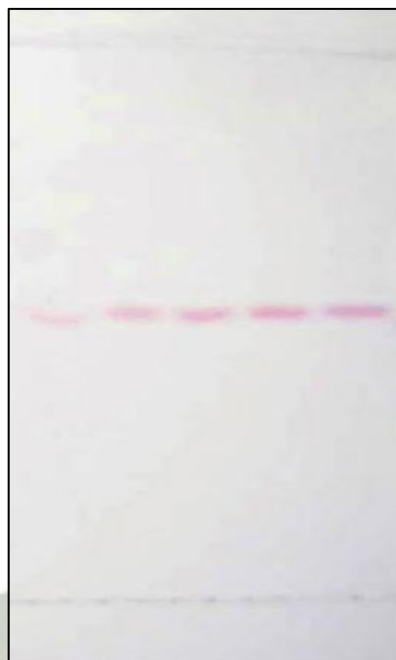


Figura 31. Placa de la determinación semicuantitativa de Amaranto.

La placa de la Figura 31 fue sometida a un análisis usando un software (ImageJ) el cual permite asignar áreas directamente proporcionales a la intensidad de cada mancha (Figura 32). Es así que se obtuvieron como resultados áreas correspondientes a cada concentración las cuales se presentan en la Tabla 5.

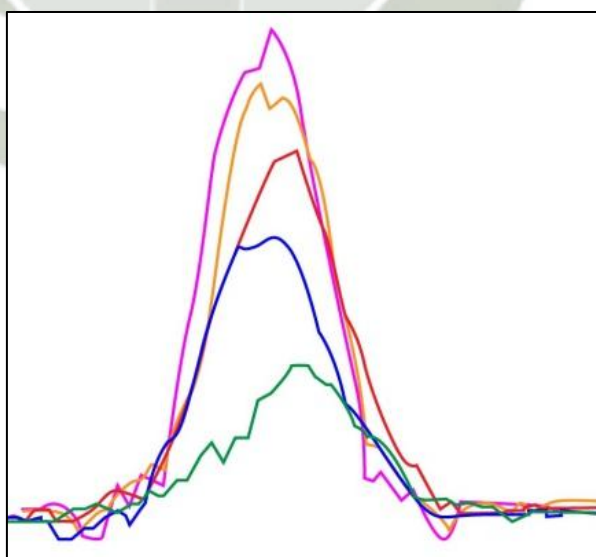


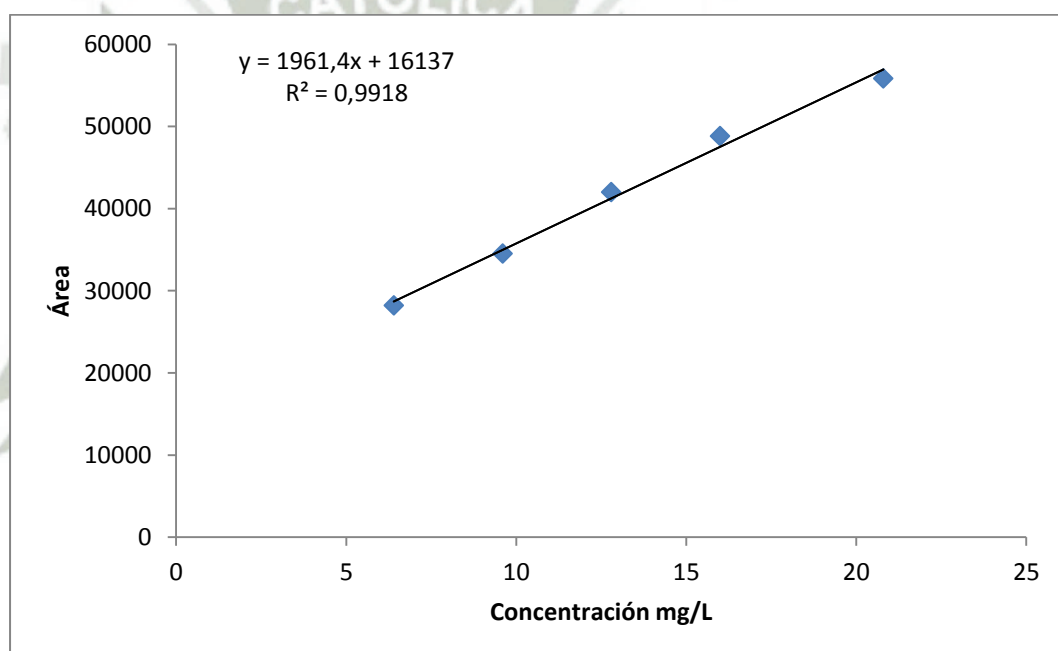
Figura 32: Linealidad del Amaranto en el TLC mediante software (ImageJ)

Tabla 5. Áreas correspondientes a amaranto usando ImageJ.

mg/L de Amaranto	ÁREA
6.40	28196.919
9.60	34502.304
12.80	41990.467
16.00	48836.810
20.80	55827.023

Fuente: Elaboración propia

Con los resultados obtenidos se realizó un gráfico de calibración el cual se observa en la Figura 33, dicho gráfico presenta una ecuación de la recta y un coeficiente de correlación lineal de 0.9918 que facilita el análisis de muestras.


Figura 33. Gráfico de calibración de amaranto por TLC

Se determinaron niveles de amaranto en diversas muestras por cromatografía en capa fina (TLC) bajo las mismas condiciones del estándar y analizándolas con ImageJ, obteniendo los resultados de la Tabla 6, usando la ecuación obtenida en la Figura 33.

Tabla 6. Determinación semicuantitativa de amaranto por TLC

Muestra	Área	Concentración (mg/L)
Chicha morada	ND	ND
Bebidas Energizantes	ND	ND
Gelatinas	ND	ND
Golosinas	ND	ND
Refrescos en polvo	ND	ND
Gaseosa color Rojo	64574.47	24.93

Fuente: Elaboración propia

***ND:** No Detectado

En la Tabla 6 se observan los resultados luego del análisis por TLC en las cuales no se detectaron presencia del colorante amaranto excepto en bebidas carbonatadas, por lo cual se procedió a validar el método por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para una cuantificación más sensible de amaranto en dichas bebidas.

2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

2.1. ELECCIÓN DEL TIEMPO DE RETENCIÓN

Para reconocer el tiempo de retención del aditivo colorante Amaranto (E-123), se utilizó un estándar primario con pureza mayor al 98 % obtenido de Sigma Aldrich de concentración de 19.2 mg/L siendo el volumen de inyección 20 μ L, usando una columna Chromolith RP 18e 100 x 4 mm, una fase móvil de acetonitrilo y bromuro de cetiltrimetilamonio (70:30) a un flujo de 2 mL/min y a una longitud de onda de 350 nm. Se obtuvo un tiempo de retención de 5 min, y el pico tenía una leve asimetría negativa ¹⁴.

Para obtener un mejor tiempo de retención se adecuó mejor la fase móvil, disminuyendo la cantidad de acetonitrilo, usando concentraciones de acetonitrilo y bromuro de cetiltrimetilamonio (50:50) a un flujo de 2 mL/min y a una longitud de onda de 350 nm. En la Figura 34 se observa el pico gaussiano del Amaranto con un tiempo de retención de 3.5 min.

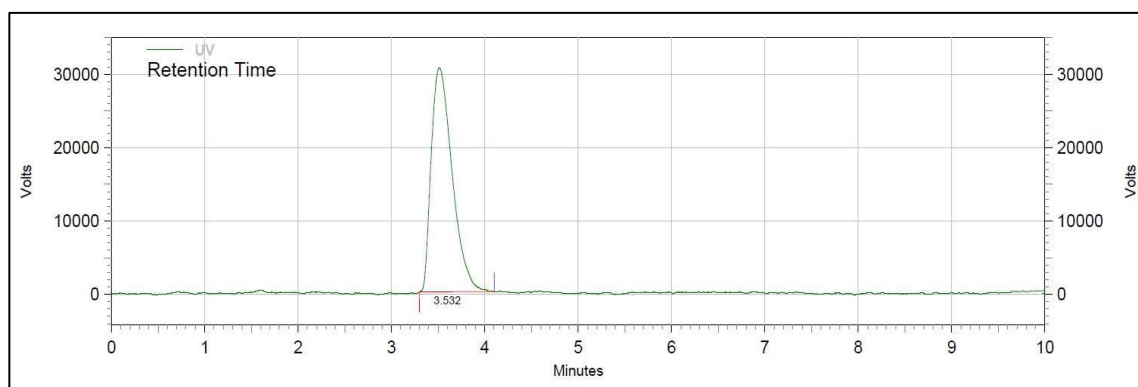


Figura 34. Cromatograma a 350 nm correspondiente al colorante Amaranto con tiempo de retención de 3.5 min.

2.2. VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE AMARANTO POR HPLC

2.2.1. LINEALIDAD

La linealidad es la proporcionalidad entre la concentración de un analito y su respectiva respuesta.

Para su desarrollo fue necesario elaborar una curva de calibración con el estándar del colorante Amaranto (E-123), para lo cual se prepararon 5 concentraciones que fueron procesadas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) por triplicado, hallando los datos de la Tabla 6.

En la Tabla 7 se observan las áreas promedio correspondientes a las concentraciones de calibración, así mismo se obtuvieron coeficientes de variación porcentual menores a 2.7 %.

Para evaluar la linealidad se prepararon 5 soluciones de concentración de 12, 19.2, 30, 39.6, 49.2 mg/L (Figura 35). En la Tabla 6 figuran los resultados de 3 mediciones y el promedio de las correspondientes mediciones.

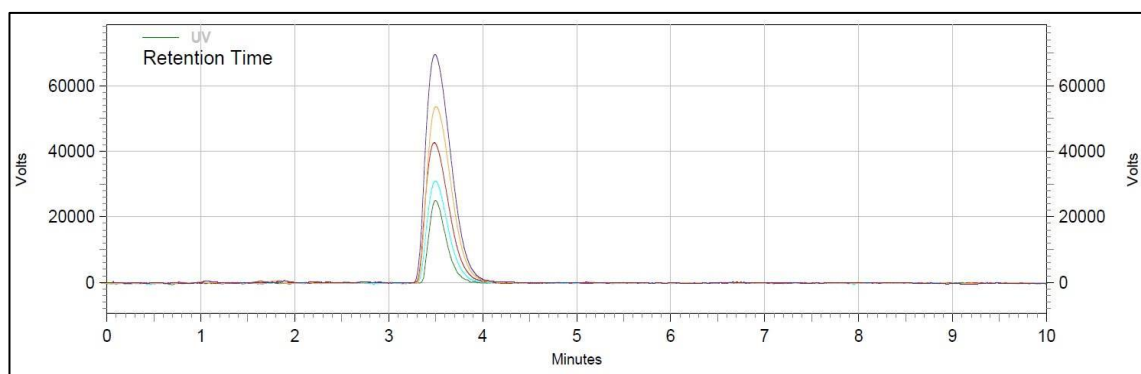


Figura 35: Linealidad del Amaranto en el HPLC.

Tabla 7. Datos de linealidad del aditivo colorante E-123 “amaranto” por HPLC

Concentración (mg/L)	Área I (mUA)	Área II (mUA)	Área III (mUA)	promedio	S	CV
12	311551	316594	317864	315336.3	3339.1	1.06
19.2	493323	497845	495755	495641.0	2263.2	0.46
30	780574	797957	789525	789352.0	8692.8	1.10
39.6	1042907	1050192	1036980	1043359.7	6617.6	0.63
49.2	1300199	1323993	1314374	1312855.3	11969.5	0.91

Fuente: Elaboración propia

El valor $r = 1$ indica una recta perfectamente lineal, $r = -1$ una recta perfectamente lineal de pendiente negativa y $r = 0$ la no correlación entre X e Y. En la práctica, r es generalmente mayor de 0,99 y los valores menores de 0,90 son raros.

En la Figura 36 se observa el grafico de calibración correspondiente a los datos de la Tabla 6, donde se presenta un coeficiente de correlación lineal r^2 de 0.9998. Para que un método analítico sea considerado lineal el coeficiente de correlación r^2 debe ser mayor a 0.995 según la USP, en el presente trabajo se obtuvo un valor superior a los establecido concluyendo que existe una correlación lineal entre el analito y su respuesta.

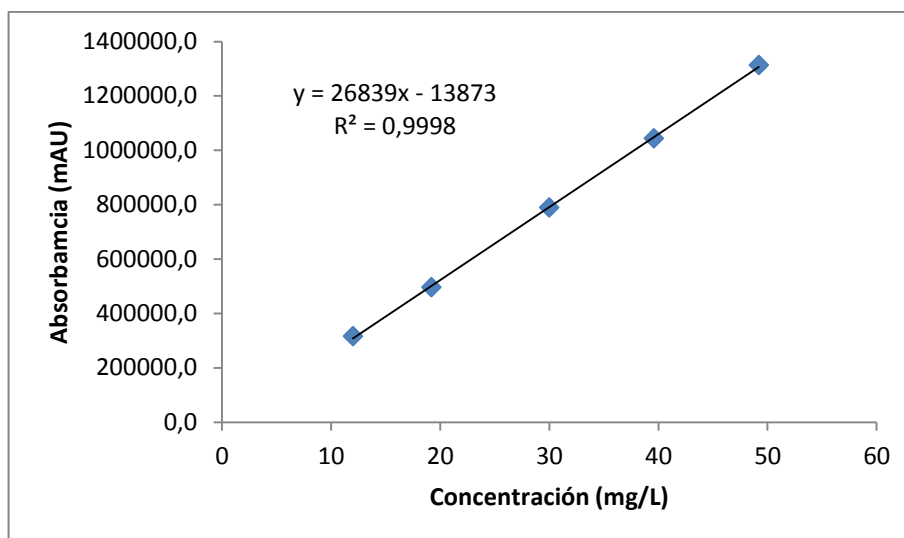


Figura 36. Gráfico de calibración correspondiente al aditivo colorante E-123 “amaranto” por HPLC

De la Figura 36 se obtienen los valores de a, b y r^2 en donde:

a	13873
b	26839
r^2	0.9998

Ivani³² en su investigación determinó y sintetizó colorantes sintéticos como el Amaranto, en bebidas carbonatadas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Fotodiodos, obteniendo un coeficiente de variación lineal r^2 de 0.9993.

Hong³¹ determinó siete colorantes sintéticos, entre ellos el amaranto, en vinos y refrescos mediante un Cromatógrafo Líquido acoplado a un Espectrómetro de Masas (LC/MS) basándose en una metodología de extracción magnética dispersiva en fase sólida, obteniendo un coeficiente de variación lineal r^2 de 0.9991.

Ni³⁴ desarrollo un método para la determinación de Amaranto por Voltametría obteniendo un coeficiente de variación lineal r^2 de 0.9985.

En el presente trabajo se obtuvo un coeficiente de variación lineal r^2 de 0.9998, obteniéndose mejores resultados de linealidad de los autores anteriores, los cuales también concluyen que existe una correlación lineal entre el analito y su respuesta.

2.2.2. SENSIBILIDAD

Parámetro que indica la cantidad mínima de analito que da un resultado significativo. Los parámetros que permitirán evaluar la sensibilidad son los límites de detección y cuantificación es por eso que con los datos obtenidos en el parámetro de linealidad se calculó el límite de cuantificación (LC) y límite de detección (LD).

- **Límites de Detección:** Según la USP es la menor concentración de analito que puede detectarse; pero no necesariamente cuantificarse ^{14,16}.
- **Límites de Cuantificación:** Según la misma referencia anterior es la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud, expresada también en unidades de concentración ^{14,16}.

A continuación se puede observar que los resultados obtenidos para el cálculo del límite de detección y de cuantificación, para el presente método analítico dieron un límite de detección de 0.25 mg/L y un límite de cuantificación de 0.29 mg/L. Los procedimientos empleados se muestran a continuación.

Tabla 8. Datos de áreas promedio y desviación estándar del aditivo colorante E-123 “amaranto” por HPLC

Concentración (mg/L)	Área I (mUA)	Área II (mUA)	Área III (mUA)	promedio	S
12	311551	316594	317864	315336.3	3339.1
19.2	493323	497845	495755	495641.0	2263.2
30	780574	797957	789525	789352.0	8692.8
39.6	1042907	1050192	1036980	1043359.7	6617.6
49.2	1300199	1323993	1314374	1312855.3	11969.5

Fuente: Elaboración propia

Con los datos de la Tabla 8, se determinó el gráfico de la concentración vs. el promedio (Figura 37), y el gráfico de concentración vs. desviación estándar (Figura 38) correspondientes al colorante Amaranto, para poder hallar los límites de detección y cuantificación.

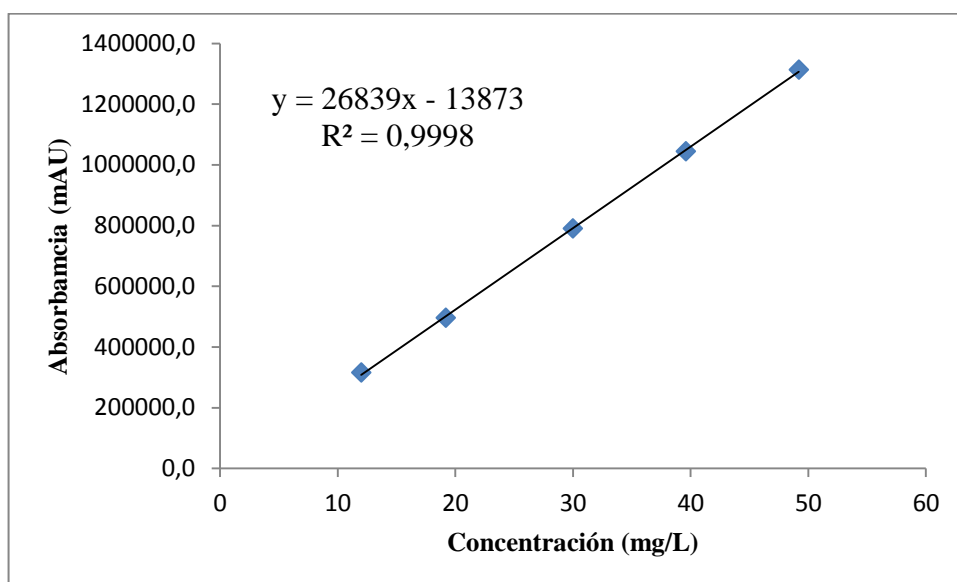


Figura 37. Gráfico de concentración vs promedio correspondiente al aditivo colorante E-123 “amaranto” por HPLC.

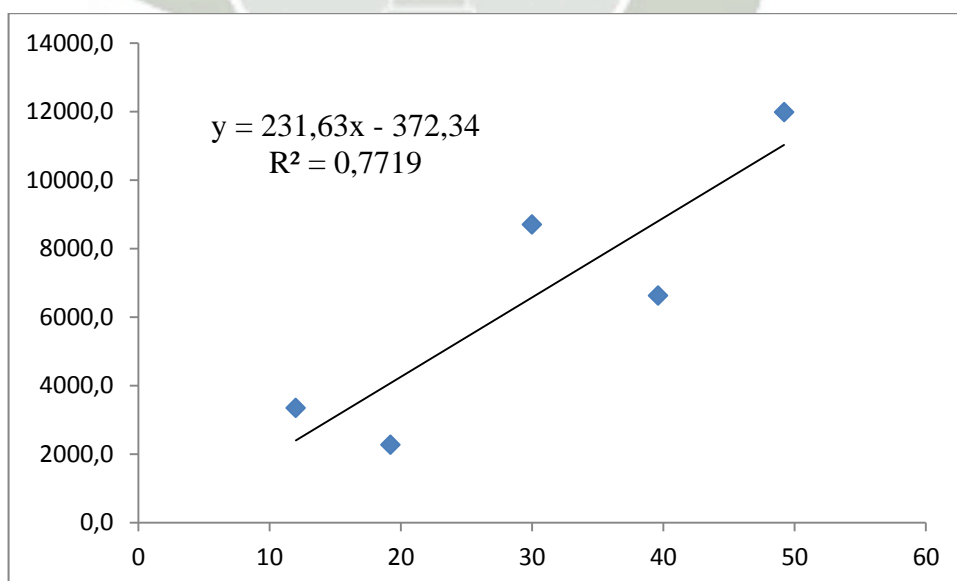


Figura 38. Gráfico de Concentración vs desviación estándar correspondiente al aditivo colorante E-123 “amaranto” por HPLC

$$Y = 231.63x - 372.34$$

$$Sbl = 372.34$$

LÍMITE DE DETECCIÓN:

$$LD = \frac{Ybl + 3(Sbl)}{b} \frac{1}{\sqrt{n}}$$

$$\text{Límite de detección} = 0.25 \text{ mg/L}$$

LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN:

$$LC = \frac{Ybl + 10(Sbl)}{b} \frac{1}{\sqrt{n}}$$

$$\text{Límite de cuantificación} = 0.29 \text{ mg/L}$$

2.2.3. PRECISIÓN

La precisión es el grado de concordancia de los resultados cuando el método es aplicado repetidamente a varias muestras de una mezcla homogénea. Generalmente es expresada como la desviación estándar; y puede ser medida por el grado de reproducibilidad o de repetibilidad de un método analítico ^{14,16}.

Se expresa matemáticamente como la desviación estándar estimada analíticamente por s o más comúnmente como la desviación estándar relativa (RSD) o coeficiente de variación (CV). La precisión debe medirse en condiciones REPETITIVAS (mismo analista, mismo día, mismo instrumento) y en condiciones REPRODUCIBLES (diferente analista, diferente día, diferente instrumento).

Para la precisión se evaluó los resultados hallando el coeficiente de variación porcentual (CV %) ya que la USP establece como límite un valor de

2.7% de CV para que un método sea considerado preciso. Por lo cual en la Tabla 9 se muestran los coeficientes de variación porcentual para cada concentración del ensayo de linealidad, en la cual se observa que dichos valores están entre 0.46 % y 1.10 %.

Tabla 9. Datos de linealidad del aditivo colorante E-123 “Amaranto” por HPLC.

Concentración mg/L	Área I (mUA)	Área II (mUA)	Área III (mUA)	promedio	S	CV
12	311551	316594	317864	315336.3	3339.1	1.06
19.2	493323	497845	495755	495641.0	2263.2	0.46
30	780574	797957	789525	789352.0	8692.8	1.10
39.6	1042907	1050192	1036980	1043359.7	6617.6	0.63
49.2	1300199	1323993	1314374	1312855.3	11969.5	0.91

Fuente: Elaboración propia

Por otro lado también fue necesario hacer un ensayo de precisión en términos de repetibilidad haciendo estimaciones fiables del desempeño del método tomando 6 muestras de 19.2 mg/L que fueron analizadas por HPLC cuyas áreas obtenidas se muestran en la Tabla 10, donde se observa un coeficiente de variación de 2.62 % estando los resultados dentro de lo estipulado por la norma de la USP por lo cual se considera que el método es preciso.

Tabla 10. Áreas correspondientes al aditivo colorante E-123 “amaranto”.

Numero	Área
1	491608
2	493323
3	497845
4	495755
5	483652
6	463487
Promedio	487611.7
Desviación estándar	12785.2
CV%	2.62

Fuente: Elaboración propia

2.2.4. EXACTITUD

La exactitud, también conocida como error sistemático o tendencia corresponde a la diferencia entre el valor obtenido (media) y el valor verdadero. La exactitud debe ser reportada como porcentaje de recuperación de una cantidad conocida de analito agregada a la muestra^{14,16}.

Se evaluó este parámetro mediante el método del porcentaje de recuperación enriqueciendo a las muestras con una cantidad conocida de estándar.

Según norma de la USP para que un método sea exacto el porcentaje de recuperación debe estar entre 90 y 110%. En la Tabla 11 se muestran los resultados obtenidos, el porcentaje de recuperación promedio fue de 100.31% estando los resultados dentro de lo estipulado por la norma de la USP se considera que el método es exacto.

Tabla 11. Porcentaje de recuperación del aditivo colorante Amaranto.

Muestra	Estándar	Muestra + Estándar	% de recuperación
515936	566017	1076499	99.04
491213	537926	1037876	101.62
496513	531071	1029490	100.36
489941	307832	798510	100.24
Promedio			100.31

Fuente: Elaboración propia

Ni³⁴ determinó Amaranto por medio de Voltametría lo valores de % recuperación que determinó se encuentran en el rango de 80.0 a 106.7 %. Por otro lado Wang³⁵ desarrollo un método para la determinación de amaranto mediante óxido de grafeno determinó un % de recuperación de valores entre 95.0 a 105.0 %. Y Han³⁰ sintetizó un sensor para la cuantificación de colorante Amaranto en 3 bebidas obteniendo un % de recuperación de 93.15 a 100.81 %.

En el presente trabajo se obtuvo un valor promedio de 100.31 % comparando los resultados obtenidos con los encontrados en las investigación de Ni³⁴; Wang³⁵ y Han³⁰ se puede afirmar que el método cuenta con una exactitud adecuada mejor que las exactitudes de los autores anteriores.

2.3. DETERMINACIÓN DE AMARANTO EN BEBIDAS CARBONATADAS

Se analizaron cinco muestras de bebidas carbonatadas (Figura 39) de las cuales dos demostraron la presencia del aditivo colorante Amaranto (E-123); de estas se tomaron tres lotes diferentes de cada una de ellas, y de cada lote tres muestras.

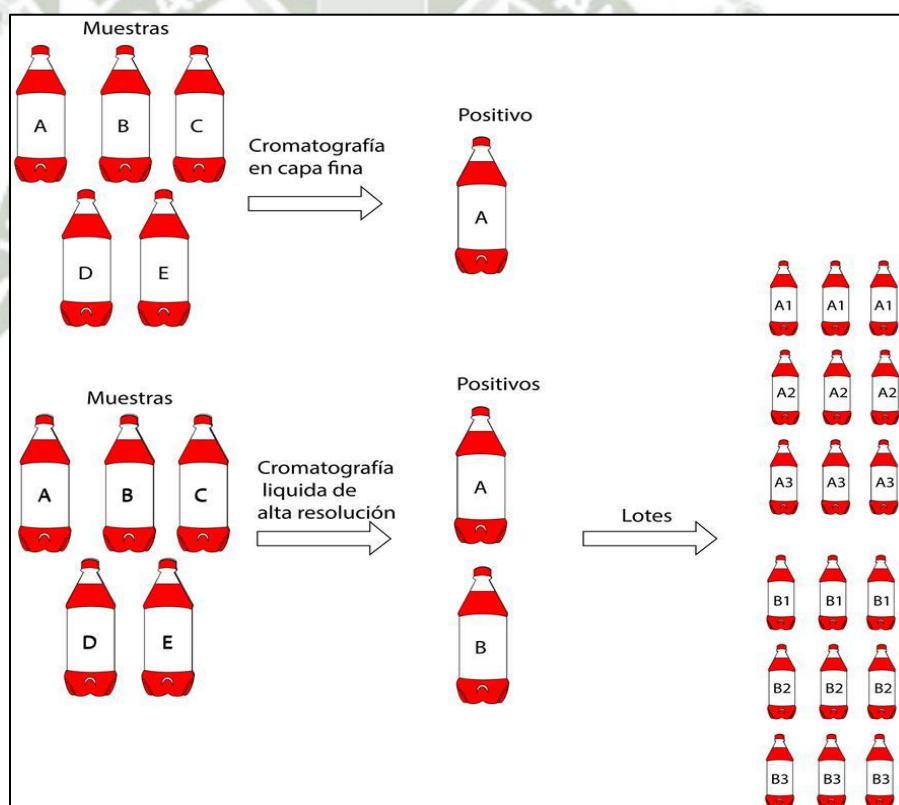


Figura 39. Selección de muestras.

De las cinco muestras analizadas, solo se encontró la presencia del colorante Amaranto en dos de ellas, en la muestra A (Figura 40) y en la muestra B (Figura 41). De cada una de las muestras se tomaron tres lotes distintos.

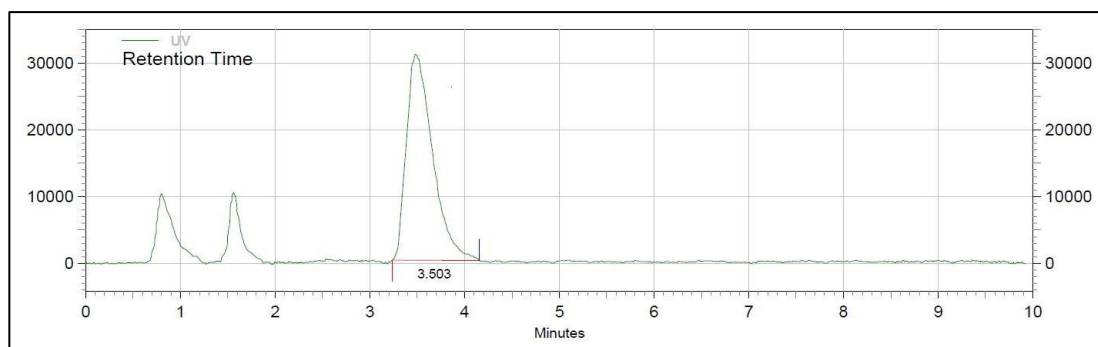


Figura 40: Cromatograma correspondiente a la muestra A, que muestra la presencia del colorante Amaranto.

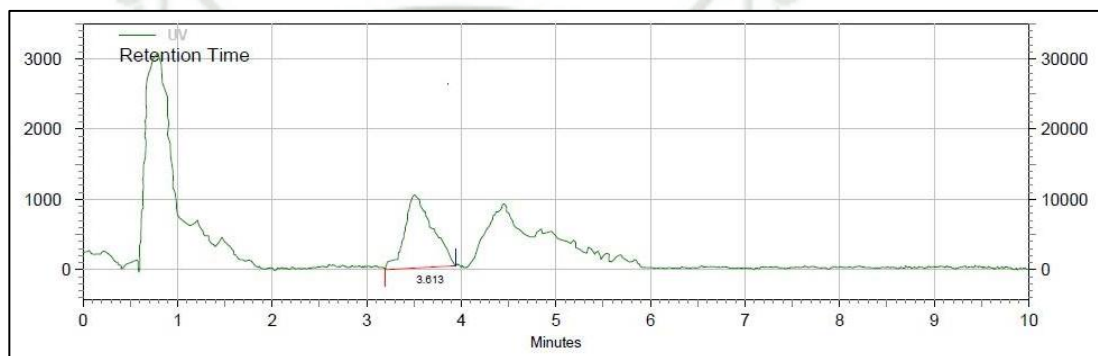


Figura 41: Cromatograma correspondiente a la muestra B, que muestra la presencia del colorante Amaranto.

En la Tabla 12 se muestra la concentración en mg/L del contenido de Amaranto en tres lotes distintos de la muestra A, para poder realizar el análisis de varianza de una vía (ANOVA), para saber si hay diferencia entre las muestras de los diferentes lotes.

Tabla 12. Concentración (mg/L) de Amaranto en lotes de muestra A por HPLC.

Muestras	Lote		
	A1	A2	A3
1	18.44	19.80	19.37
2	18.53	19.88	19.29
3	18.70	20.01	18.78

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 13 se muestran los resultados obtenidos luego del análisis de varianza (ANOVA) de una vía donde se observa que el valor F experimental (31.54) es mayor al F crítico (5.14), concluyendo que al menos un lote es diferente al 95 % de confianza. Por otro lado dicho resultado se corrobora con el valor de la probabilidad que es menor a 0.05.

Tabla 13. Análisis de Varianza (ANOVA) para Muestra A.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2.71	2	1.35	31.54	0.0007	5.14
Dentro de los grupos	0.26	6	0.04			
Total	2.96	8				

Fuente: Elaboración propia

Para demostrar si solo un grupo es diferente se procedió a realizar un test de Tukey. En la Tabla 14 se puede observar los resultados obtenido al realizar dicho análisis estadístico de comprobación, evidenciándose que los tres lotes son diferentes al 95 % de confianza (ver Figura 42).

Tabla 14. Resumen del Análisis de Varianza de una vía de la muestra A.

LOTE	N	Promedio	Agrupamiento
A2	3	19.8964	A
A3	3	19.1452	B
A1	3	18.5563	C

Fuente: Elaboración propia

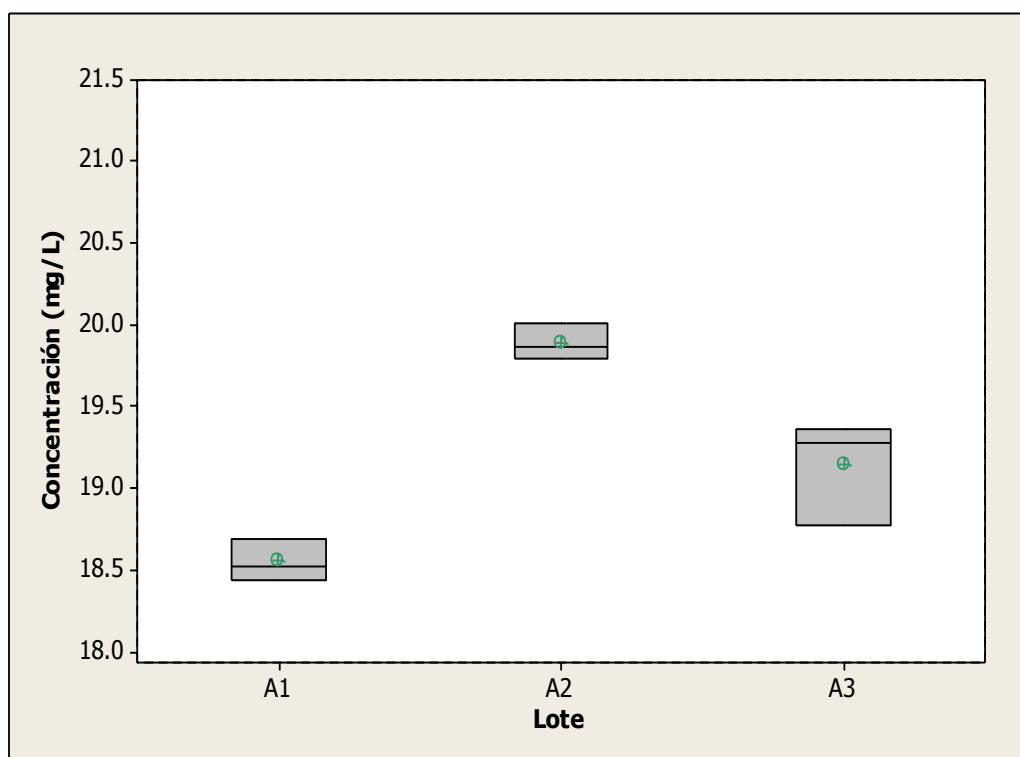


Figura 42. Diagrama de cajas y bigotes para muestra A.

En la Tabla 15 se muestra la concentración en mg/L del contenido de Amaranto en tres lotes distintos de la muestra B, para poder realizar el análisis de varianza de una vía (ANOVA), para saber si hay diferencia entre las muestras de los diferentes lotes.

Tabla 15. Concentración (mg/L) de Amaranto en lotes de muestra B por HPLC.

Muestras	Lote		
	B1	B2	B3
1	1.63	1.45	1.58
2	1.70	1.38	1.56
3	1.66	1.47	1.60

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 16 se muestran los resultados obtenidos luego del análisis de varianza (ANOVA) de una vía donde se observa que el valor F experimental (31.82) es mayor al F crítico (5.14), concluyendo que al menos un lote es diferente al 95 % de confianza. Por otro lado dicho resultado se corrobora con el valor de la probabilidad que es menor a 0.05.

Tabla 16. Análisis de Varianza (ANOVA) para Muestra B.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.08	2	0.041	31.82	0.0006	5.14
Dentro de los grupos	0.01	6	0.001			
Total	0.09	8				

Fuente: Elaboración propia

Para demostrar si solo un grupo es diferente se procedió a realizar un test de Tukey. En la Tabla 17 se puede observar los resultados obtenidos al realizar dicho análisis estadístico de comprobación, evidenciándose que los tres lotes son diferentes al 95 % de confianza (ver Figura 43).

Tabla 17: Resumen del Análisis de Varianza de una vía de la muestra B.

Lote	N	Promedio	Agrupamiento
B1	3	1.66366	A
B3	3	1.58027	A
B2	3	1.43238	B

Fuente: Elaboración propia

Llamas²⁹ en su investigación desarrolló un método para determinar tres colorantes entre ellos el Amaranto (E-123) por espectrofotometría UV-vis donde encontró la presencia de este, en bebidas no alcohólicas, realizando solamente un análisis cualitativo, mas no cuantitativo.

Bazu⁴¹ realizó un estudio espectroscópico y termodinámico complejo de la interacción del aditivo colorante Amaranto (E-123) con la hemoglobina, donde se hallaron efectos tóxicos de este colorante.

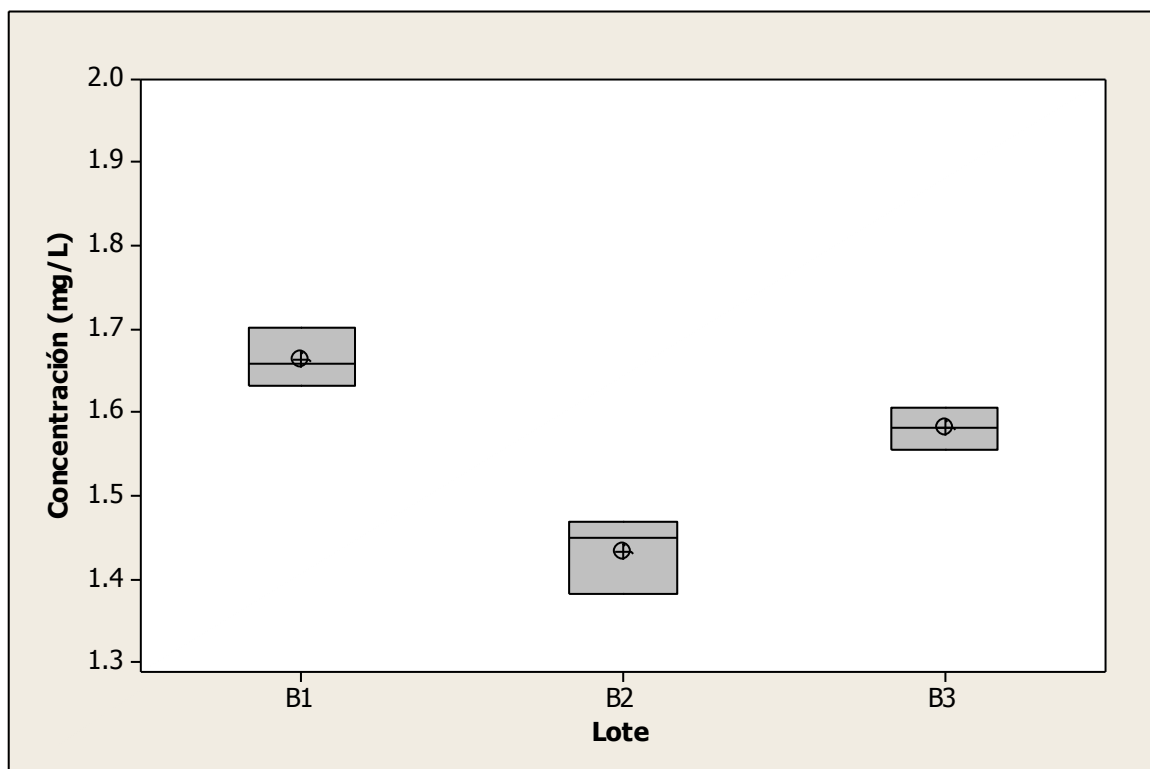


Figura 43. Diagrama de cajas y bigotes para muestra B.

Whang³³ determinó el aditivo colorante Amaranto (E-123) en bebidas mediante oxido de grafeno, hallando cualitativamente la presencia del colorante.

Mohamed⁴² administró dosis de hasta 10 veces más la ingesta diaria aceptable de tres colorantes azoicos, entre ellos el Amaranto; ejerciendo un efecto depresor sobre la respuesta inmune celular.

Marovatsanga⁴⁷ demuestra que para los colorantes sintéticos, los estudios más populares son los de determinación y no de cuantificación, en el presente trabajo podemos observar la importancia de la sensibilidad de la técnica, en el estudio previo por Cromatografía en Capa Fina (TLC) solo se demostró presencia del aditivo colorante Amaranto (E-123) en una de las muestras de bebidas carbonatadas para luego por medio de la Cromatografía de Alta Resolución (HPLC) por su mayor sensibilidad se pudo demostrar que estaba presente en dos muestras.

2.4. Concentración de Amaranto en bebidas carbonatadas

Mediante la ecuación de la recta se hallaron las concentraciones de Amaranto de las dos muestras de bebidas carbonatadas, en la Figura 42 observamos los niveles de Amaranto correspondientes a los lotes de ambas muestras.

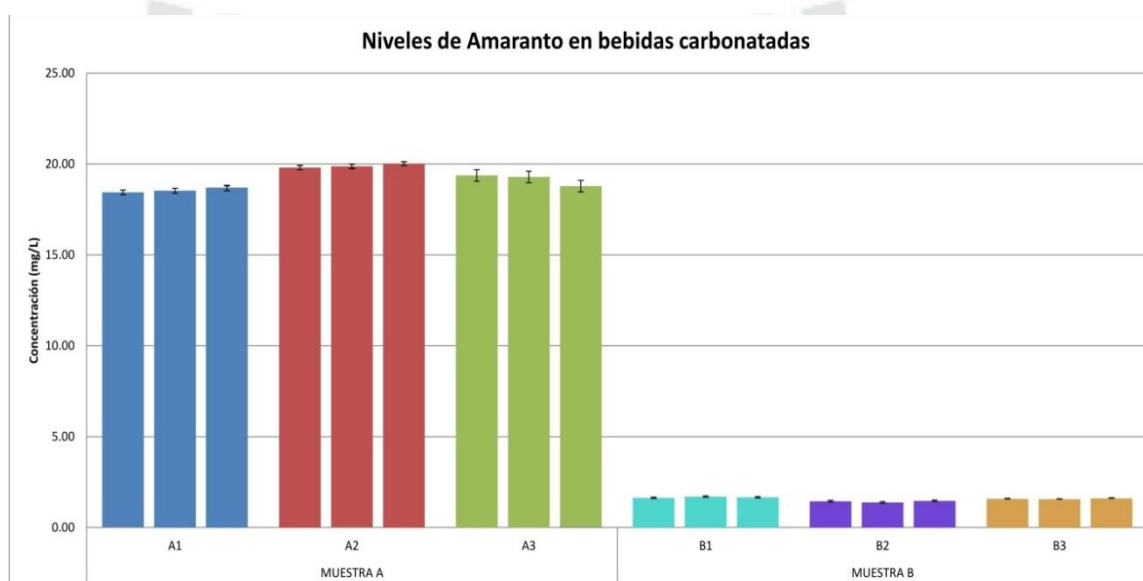


Figura 44. Diagrama de niveles de Amaranto en las muestras de bebidas carbonatadas.

En la Figura 44 se muestran los niveles de Amaranto encontrados en los distintos lotes de las muestras A y B, hallando un promedio de 19,19 y 1,56 mg/L respectivamente, la detección de estos valores de Amaranto incumple la normativa peruana que prohíbe completamente la utilización de este colorante (Ver Anexos), por tener antecedentes de causar efectos nocivos para la salud como teratogenicidad, carcinogenicidad, mutagenicidad y embriotoxicidad ^{25,26}. También puede causar problemas de hipersensibilidad, hiperactividad y formación de metahemoglobina por ser un colorante azoico ^{12,27}.

Esto constituye un problema para la salud pública debido al elevado consumo de estas bebidas, por ser un producto envasado y elaborado en la ciudad de Arequipa; debiendo exigir un mayor control del adecuado uso de los aditivos alimentarios.



CONCLUSIONES

1. Se evaluó distintas matrices identificando el colorante Amaranto (E-123) en una muestra de bebida carbonatada roja, por Cromatografía en Capa Fina (TLC) y se realizó una medición semicuantitativa mediante el Software ImageJ.
2. Se validó el método utilizando una columna Chromolith RP 18e 100 x 4 mm y una fase móvil de acetonitrilo y bromuro de Cetiltrimetilamonio (50:50), obteniendo un tiempo de retención de 3.5 min.
3. Se detectó y cuantificó el colorante Amaranto (E-123) por cromatografía líquida de alta resolución en dos muestras de bebidas carbonatadas rojas.
4. Se comparó los valores de 19.19 y 1.56 mg/ L encontrados en las muestras observándose que ninguna de ellas sobrepasa los niveles de ingesta diaria no constituyendo un problema de salud.
5. Se evaluó la presencia de Amaranto en las muestras de bebidas carbonatadas incumpliendo la normativa peruana que indica que dicho colorante está prohibido.

SUGERENCIAS

Como resultado del presente trabajo realizamos las siguientes sugerencias:

1. Un mayor control en el uso de colorantes en productos alimentarios por parte del organismo regulador DIGESA.
2. Realizar estudios concluyentes acerca de los efectos adversos del colorante Amaranto en el Perú.
3. Ampliar el estudio en los aditivos utilizados en productos de repostería de mayor consumo.
4. Validar la determinación de Amaranto por otros métodos analíticos.



REFERENCIAS

1. Espinoza de los Monteros M., Rueda M., Castillo M., Espinoza de los Monteros M., Ceballos R., Fernández S. Estudio de los aditivos alimentarios y su repercusión en la población infantil. Medicina de Familia (And); 1 25-30. (2002)
2. Ibañez F., Torre P., Irigoyen A. Aditivos Alimentarios. Universidad Pública de Navarra, Área de Nutrición y Bromatología. (2003)
3. Hernández J. Aditivos Alimentarios. Universidad Autónoma de Madrid. Diplomatura de Nutrición Humana y Dietética. (2011)
4. Gil A., Ruiz M. Tratado de Nutrición 2^{da} Edición. Tomo II Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos, 429-451. (2010)
5. Silva M., Virna M., Ronielson F., Carvalho C., Perón A. Citotoxicity of food dyes Sunset Yellow (E-102), Bordeaux Red (E-123), and Tartrazine Yellow (E-102) on *Allium cepa* L. root meristematic cells. Food, Science and Technology (Campinas), vol. 33 no.1 218-223. (2013)
6. Zollinger H. Color Chemistry: Syntheses, Properties, and Applications of Organic Dyes and Pigments. Third, revised edition. (2003)
7. Sánchez R. La química del color en los alimentos. Revista Química Viva, Año 3, No 12 234-246. (2013)
8. Rodríguez S. Identificación y Cuantificación de colorantes artificiales en refrescos en polvo elaborados y/o distribuidos en Guatemala. Guatemala. Universidad San Carlos de Guatemala. (2008)
9. Delgado M., Pérez J. Identificación de colorantes azoicos permitidos en refrescos coloreados de rehidratación oral elaborados en El Salvador. El Salvador. Universidad de El Salvador. (2006)

10. Esteban S. Química y cultura científica. Madrid. Universidad Nacional de Educación a Distancia, 44-52. (2010)
11. Garrigós M. Desarrollo de Métodos Analíticos para la determinación de compuestos Tóxicos constituyentes de Colorantes Azo, Alicante. Tesis Doctoral de la universidad de Alicante. (2003)
12. Cobo C. Consulta de tecnología de los alimentos. Colorantes. Calceta. Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López. (2013)
13. Sánchez S. El daño que producen las bebidas gaseosas. Escuela de Nutrición de la Universidad de Finis Terrae. (2013)
14. Quattrocchi O., Abelaira S., Laba R. Introducción a la HPLC, Aplicación y Práctica, Primera Edición, Argentina. (1992)
15. Duffau B., Rojas F., Guerrero I., Roa L., Rodríguez L., Soto M., Aguilera M., Sandoval S. Validación de Métodos y Determinación de la Incertidumbre de la Medición: “Aspectos Generales sobre la Validación de Métodos”. Santiago. Instituto de Salud Pública de Chile. (2010)
16. Hernández B. Validación del Método analítico por HPLC para disolución de Levonorgestrel 1.5 mg grajeas. Veracruz, México, Universidad Veracruzana. (2014)
17. Gonzáles J. Técnicas y Métodos de Laboratorio Clínico, Tercera Edición, 197-210. (2010)
18. Guarnizo A., Martínez P. Experimentos de Química Orgánica con enfoque en ciencias de la vida, Ediciones Elizcom, 101-106. (2009)

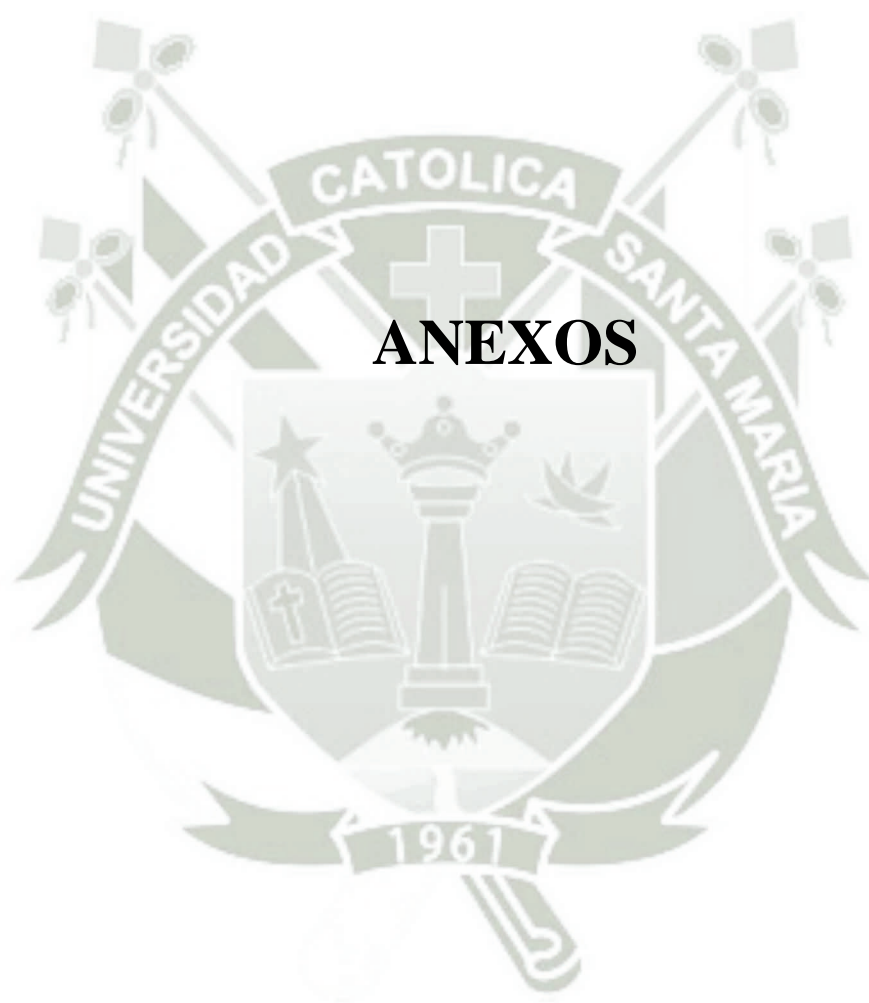
19. Gonzáles J. Técnicas de Laboratorio Clínico, Primera Edición, Editorial Alambra, Madrid, España, 128-141. (1985)
20. Smith I., Feinberg J. Paper & Thin Layer Chromatography and Electrophoresis. Shandon Scientific Company, Ltd. (1965)
21. Skoog D., West D., Holler F. Fundamentos de Química Analítica, Cuarta Edición, Editorial Reverté S.A., Barcelona, 709-732. (1997)
22. Merrill, Richard A. "Reglamento de seguridad de alimentos: reformar la Cláusula Delaney" en *Revisión anual de la salud pública*, 18 313-340. (1997)
23. Andrianova, M. Carcinogenic properties of the red food dyes amaranth, Ponceau SX and Ponceau 4R. *Vop. Piturt*, 29-61. (1970)
24. Baigusheva. M. Carcinogenic properties of amaranth paste. *Vop. Pitan.* 27, 46. (1968)
25. Shtenberg A., Gavrilenko E. Effect of amaranth food dye on reproductive function and progeny development in experiments with albino rats. *Vop. Pitan*, 29, 66. (1970)
26. Collins T., Mclaughlin J. Teratology Studies on Food Colourings. Part II. Embryotoxicity of R Salt and Metabolites of Amaranth (FD & C Red No. 2) in Rats *Fd Cosmet. Toxicol* Vol. 11, 355-365. (1963)
27. Weisburger J. Comments on the history and importance of aromatic and heterocyclic amines in public health. *Mutat. Res.*, 506-507, 9-20. (2002)
28. Brown M., De Vito C. Predicting azo dye toxicity. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol*, 23, 249-324. (1993)
29. Llamas N., Garrido M., Di Nezio M., Fernández B. Second order advantage in the determination of amaranth, sunset yellow FCF and tartrazine by UV-vis and

- multivariate curve resolution alternating least squares. *Analytica Chimica Acta*, 655 38–42. (2009)
30. Han Q., Wang X., Yang Z., Zhu W. , Zhou X., Jiang H. Fe₃O₄@rGO doped molecularly imprinted polymermembrane based on magnetic field directedself-assembly for the determination of amaranth. *Talanta* 123 101–108. (2014)
 31. Hong X., Zhaoa Y. , Shenc h., Zhoud L, Pana S. , Jin M Fast determination of seven synthetic pigments from wine and soft drinks using magnetic dispersive solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry *Journal of Chromatography A*, 1346 123–128. (2014)
 32. Ivani F., Florindo M., Pinto I, Pereira F., Salmito P., Costa C., Marques M, de Matos L. Determination of synthetic food dyes in commercial soft drinks by TLC and ion-pair HPLC. *Food Chemistry* 157 193–198. (2014)
 33. Wang M., Gao Y., Sun Q., Zhao J. Ultrasensitive and simultaneous determination of the isomers of Amaranth and Ponceau 4R in foods based on new carbon nanotube/polypyrrole composites. *Food Chemistry* 172 873–879. (2015)
 34. Ni Y., Bai J. Simultaneous determination of Amaranth and Sunset Yellow by ratio derivative voltammetry. *Talanta* 44 105-109. (1997)
 35. Wang M. , Sun Y., Yang X., Zhao J. Sensitive determination of Amaranth in drinks by highly dispersed CNT in graphene oxide “water” with the aid of small amounts of ionic liquid . *Food Chemistry* 179 318–324. (2015)
 36. Nuñez O. Columnas monolíticas de base sílice: propiedades, preparación, modificaciones químicas y aplicaciones en cromatografía de líquidos. Departamento de Química Analítica. Facultad de Química. Universidad de Barcelona. Martí i Franqués 08028, 1-11. (2008)

37. Larsson K. A teratologic study with the dyes amaranth and ponceau 4R in mice. *Toxicology*, 4 75-82. (1975)
38. Tanaka T. Effects of amaranth on F₁ generation mice. *Toxicology Letters*, 60 315-324. (1992)
39. Prival M., Davis V., Peiperl M., Bell S. Evaluation of azo food dyes for mutagenicity and inhibition of mutagenicity by methods using *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research*, 206, 247–259. (1988)
40. Ishidate M., Sofuni T., Yoshikawa K., Hayashi M., Nohmi T., Sawada M., et al. Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. *Food and Chemical Toxicology*, 22, 623–636. (1984)
41. Basu A., Suresh G. Interaction of toxic azo dyes with heme protein: Biophysical insights into the binding aspect of the food additive amaranth with human hemoglobin. *Journal of Hazardous Materials* 289, 204–209. (2015)
42. Mohamed M., Attia H., Mahmoud S., Somaia A., Gihan F. Immunological studies on Amaranth, Sunset Yellow and Curcumin as food colouring agents in albino rats. *Food and Chemical Toxicology* 48, 1581–1586. (2010)
43. Tanaka T. Effects of amaranth on F₁, generation mice. *Toxicology Letters* 60, 315-324. (1992)
44. Mpountoukas P., Pantazaki A., Kostareli E., Christodoulou P., Kareli D., Poliliou S., Mourelatos C., Lambropoulou V., Lialiaris T. Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine. *Food and Chemical Toxicology* 48, 2934–2944. (2010)

45. Shabbir S., Faheem M., Ali N., Kerr P., Wu Y. Evaluating role of immobilized periphyton in bioremediation of azo dye amaranth. *Bioresource Technology* 11, 115-120. (2016)
46. Al-Mossawi J. The Mutagenic Effect Of Amaranth (Fd And C Red No. 2) In Bacteria And Yeast. *Environment International*, Vol. 9, pp. 145-148. (1983)
47. Marovatsanga Macrae R. The Determination of Added Azo Dye in Soft Drinks via its Reduction Products. *Food Chemistry* 24, 83-98. (1987)





ANEXOS

El Peruano
Lima, miércoles 19 de diciembre de 2012

NORMAS LEGALES

481203

medicamentos, insumos y drogas en el Sector Salud y el Decreto Supremo N° 023-2005-S.A. que aprueba el Reglamento de Organización y Funciones del Ministerio de Salud, establece en su artículo 53° literal b) entre otras funciones generales para la Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas, el normar en aspectos relacionados con la calidad, seguridad y eficacia de los medicamentos, otros productos farmacéuticos y anes;

Que, mediante la Ley de los Productos Farmacéuticos, Dispositivos Médicos y Productos Sanitarios, Ley N° 29459 publicada el 26 de Noviembre del 2009, se den en y establecen los principios, normas, criterios y exigencias básicas sobre los productos farmacéuticos, dispositivos médicos y productos sanitarios de uso en seres humanos;

Que, el numeral 8 de la Séptima Disposición Complementaria Final del Reglamento para el Registro, Control y Vigilancia Sanitaria de Productos Farmacéuticos, Dispositivos Médicos y Productos Sanitarios aprobado por Decreto Supremo N° 016-2011-SA prevé que la Autoridad Nacional de Productos Farmacéuticos, Dispositivos Médicos y Productos Sanitarios (ANM) aprobará el Listado de productos galénicos calificados como tales para la inscripción y reinscripción en el registro sanitario;

Que, asimismo, el Artículo 114° del referido Reglamento, indica que sólo se consideran productos galénicos a los contenidos en la lista establecida por la Autoridad Nacional de Productos Farmacéuticos, Dispositivos Médicos y Productos Sanitarios;

Que, en ese sentido resulta necesario establecer el Listado de Productos Galénicos, el cual ha sido elaborado tomando como referencia a los productos galénicos registrados en el Sistema Nacional de Información de Medicamentos (SNIM) - Módulo de Registro de Productos Galénicos y las farmacopeas consultadas tales como: Farmacopea Europea, Farmacopea Británica y Farmacopea de Estados Unidos; el mismo que servirá de base para los procedimientos de inscripción y reinscripción en el registro sanitario de estos productos y será actualizado periódicamente;

Que, de conformidad con lo dispuesto en la Ley del Ministerio de Salud N° 27657, el Reglamento de Organización y Funciones del Ministerio de Salud aprobado por Decreto Supremo N° 023-2005-S.A., la Ley de los Productos Farmacéuticos, Dispositivos Médicos y Productos Sanitarios, Ley N° 29459, el Reglamento para el Registro, Control y Vigilancia Sanitaria de Productos Farmacéuticos y Anes aprobado por Decreto Supremo N° 016-2011-SA, y demás normas vigentes pertinentes;

SE RESUELVE:

Artículo Primero.- APROBAR el "Listado de Productos Galénicos", que en documento adjunto forma parte integrante de la presente Resolución;

Artículo Segundo.- Disponer la publicación de la presente Resolución en el Diario Oficial "El Peruano" y en la dirección electrónica del Portal de Internet del Ministerio de Salud: http://www.minsa.gob.pe/transparencia/dge_normas.asp.

Regístrese, comuníquese y cúmplase

PEDRO LUIS YARASCA PURILLA
Director General (e)
Dirección General de Medicamentos,
Insumos y Drogas

879443-1

Aprueban Listado de Colorantes

**RESOLUCIÓN DIRECTORAL
N° 139-2012-DIGEMID-DG-MINSA**

Lima, 31 de Octubre del 2012

VISTO: el Informe Técnico N° 153-2012-DIGEMID-DAS-ERPF/MINSA de fecha 28 de setiembre del 2012 emitido por la Dirección de Autorizaciones Sanitarias referido al Listado de Colorantes;

CONSIDERANDO:

Que, la Ley del Ministerio de Salud N° 27657, en su Artículo 26° establece que la Dirección General de

Medicamentos, Insumos y Drogas es el órgano técnico-normativo en los aspectos relacionados al control de la producción, distribución y comercialización de los medicamentos, insumos y drogas en el Sector Salud y el Decreto Supremo N° 023-2005-S.A. que aprueba el Reglamento de Organización y Funciones del Ministerio de Salud, establece en su artículo 53° literal b) entre otras funciones generales para la Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas, el normar en aspectos relacionados con la calidad, seguridad y eficacia de los medicamentos, otros productos farmacéuticos y anes;

Que, mediante la Ley de los Productos Farmacéuticos, Dispositivos Médicos y Productos Sanitarios, Ley N° 29459 publicada el 26 de Noviembre del 2009, se den en y establecen los principios, normas, criterios y exigencias básicas sobre los productos farmacéuticos, dispositivos médicos y productos sanitarios de uso en seres humanos;

Que, el numeral 4 de la Séptima Disposición Complementaria Final del Reglamento para el Registro, Control y Vigilancia Sanitaria de Productos Farmacéuticos, Dispositivos Médicos y Productos Sanitarios aprobado por Decreto Supremo N° 016-2011-SA prevé que la Autoridad Nacional de Productos Farmacéuticos, Dispositivos Médicos y Productos Sanitarios (ANM) aprobará el Listado de Colorantes;

Que, en ese sentido, resulta necesario establecer el Listado de Colorantes, el cual ha sido elaborado tomando como referencia la última edición del Code of Federal Regulations (C.F.R.) de los Estados Unidos de Norteamérica y/o los códigos aprobados por la Unión Europea y Japón; el mismo que servirá de base para los procedimientos de inscripción, reinscripción y cambios de productos y dispositivos;

Que, de conformidad con lo dispuesto en la Ley del Ministerio de Salud N° 27657, el Reglamento de Organización y Funciones del Ministerio de Salud aprobado por Decreto Supremo N° 023-2005-S.A., la Ley de los Productos Farmacéuticos, Dispositivos Médicos y Productos Sanitarios, Ley N° 29459, el Reglamento para el Registro, Control y Vigilancia Sanitaria de Productos Farmacéuticos y Anes aprobado por Decreto Supremo N° 016-2011-SA, y demás normas vigentes pertinentes;

SE RESUELVE:

Artículo Primero.- APROBAR el "Listado de Colorantes", que en documento adjunto forma parte integrante de la presente Resolución;

Artículo Segundo.- Disponer la publicación de la presente Resolución en el Diario Oficial "El Peruano" y en la dirección electrónica del Portal de Internet del Ministerio de Salud: http://www.minsa.gob.pe/transparencia/dge_normas.asp;

Regístrese, comuníquese y cúmplase

PEDRO LUIS YARASCA PURILLA
Director General (e)
Dirección General de Medicamentos,
Insumos y Drogas

879443-2

Aprueban Listado de referencias bibliográficas que sustentan la seguridad de uso y uso tradicional de recursos naturales o sus asociaciones

**RESOLUCIÓN DIRECTORAL
N° 140-2012-DIGEMID-DG-MINSA**

Lima, 31 de Octubre del 2012

VISTO: el Informe Técnico N° 150-2012-DIGEMID-DAS-ERPF/MINSA de fecha 28 de setiembre del 2012 emitido por la Dirección de Autorizaciones Sanitarias referido al Listado de referencias bibliográficas que sustentan la seguridad de uso y uso tradicional de recursos naturales o sus asociaciones;

CONSIDERANDO:

Que, la Ley del Ministerio de Salud N° 27657, en su Artículo 26° establece que la Dirección General de

MINISTERIO DE SALUD
DIGEMID

Título: LISTADO DE COLORANTES

Página: 3 de 11

NÚMERO COLOR INDEX	COLOR	NOMBRE COLOR INDEX	NÚMERO CAS	NÚMERO O NOMBRE COMUNIDAD EUROPEA	CÓDIGO EC	NOMBRE JAPÓN	CÓDIGO O NOMBRE USA	OTROS NOMBRES	USOS	OBSERVACIONES
48 C15980	NARANJA	FOOD ORANGE 2	2347-72-0	15980	E111			ORANGE GGN	COS	PERMITIDO EN TODOS LOS PRODUCTOS
48 C15985	AMARILLO	FOOD YELLOW 3	2783-94-0	15985	E110	AMARILLO No. 5	FDC6AM	AMARILLO OCASO, SUNSET YELLOW FCF, FOOD SUNSET YELLOW	MED Y COS	EN LA LISTA PROVISIONAL DE LA FDA-98
50 C16035	ROJO	FOOD RED 17	25956-17-6	16035			FDC40RO	ALLURA RED	MED Y COS	EN COSMÉTICOS MENOS ÁREA DE OJOS
51 C16150	ROJO	ACID RED 26; FOOD RED 5	3761-53-3			ROJO No. 503		PONGEAU 2R		
52 C16155	ROJO	FOOD RED 6	3564-09-8			ROJO No. 502	FDC1RO	PONGEAU 3R	MED Y COS	NO USAR PARA MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y COSMÉTICOS
53 C16185	ROJO	ACID RED 27; FOOD RED 9	915-67-3	16185	E123	ROJO No. 2	FDC2RO	AMARANTH	MED Y COS	CIR 256/76 PROHIBIDO EN MEDICAMENTOS
54 C16230	NARANJA	ACID ORANGE 10; FOOD ORANGE 4	1936-15-B	16230				ORANGE G	COS	NO ENTRA EN CONTACTO CON MEMBRANAS MUCOSAS
55 C16255	ROJO	ACID RED 18; FOOD RED 7	2611-82-7	16255	E124	ROJO No. 102		PONGEAU 4R, NEW COCCINE	MED Y COS	SIN RESTRICCIONES
56 C16290	ROJO	ACID RED 41; FOOD RED 8	5650-44-2	16290	E126			PONGEAU 6R	COS	PERMITIDO EN TODOS LOS PRODUCTOS
57 C17200	ROJO	ACID RED 33; FOOD RED 12	3567-66-6	17200		ROJO No. 227	DC33RO	FAST ACID MAGENTA, ACID FUCHSIN D, NAPHTHALENE RED B	COS	PERMITIDO EN TODOS LOS PRODUCTOS
58 C18050	ROJO	ACID RED 1; FOOD RED 10	3734-67-6	18050				FAST CRIMSON 1	COS	ENTRA EN CONTACTO BREVE CON LA PIEL
59 C18097	AZUL	REACTIVE BLUE 21	12236-86-1					REACTIVE BLUE 21	DISPOSI	
60 C18130	ROJO	ACID RED 155	10236-37-0	18130				FAST RED 5BL	COS	ENTRA EN CONTACTO BREVE CON LA PIEL
61 C18680	AMARILLO	ACID YELLOW 121; SOLVENT YELLOW 21	5601-29-6	18680				FENAPLEX YELLOW NR	COS	ENTRA EN CONTACTO BREVE CON LA PIEL
62 C18735	ROJO	ACID RED 180	6408-26-0	18735				ERGANIL RED RC	COS	ENTRA EN CONTACTO BREVE CON LA PIEL
63 C18820	AMARILLO	ACID YELLOW 11	6355-82-5	18820		AMARILLO No. 407		FAST LIGHT YELLOW 3G, FLAVINIL	COS	ENTRA EN CONTACTO BREVE CON LA PIEL
64 C18950	AMARILLO	ACID YELLOW 40	6372-96-9			AMARILLO No. 402		POLAR YELLOW 5G		
65 C18965	AMARILLO	ACID YELLOW 17; FOOD YELLOW 5	6355-98-4	18965				YELLOW 2G	COS	PERMITIDO EN TODOS LOS PRODUCTOS
66 C19140	AMARILLO	ACID YELLOW 23; FOOD YELLOW 4	1934-21-0	19140	E102	AMARILLO No. 4	FDC5AM	TARTRAZINE	MED Y COS	CIR 2009 4-7-86 ADVERTENCIAS POR ALERGIAS
67 C20040	AMARILLO	PIGMENT YELLOW 16	5979-28-2	20040				PERMANENT YELLOW NCG	COS	ENTRA EN CONTACTO BREVE CON LA PIEL
68 C20170	NARANJA	ACID ORANGE 24	1320-07-6	20170		MARRÓN No. 201	DC11MA		COS	NO ENTRA EN CONTACTO CON MEMBRANAS MUCOSAS
69 C20285	MARRÓN	FOOD BROWN 3	4555-89-3		E155			BROWN HT, Chocolate Brown HT		
70 C20470	NEGRO	ACID BLACK 1; BASIC BLACK 4; SOLVENT BROWN 12	1064-48-8	20470		NEGRO No. 401			COS	ENTRA EN CONTACTO BREVE CON LA PIEL

DIRECCIÓN GENERAL DE MEDICAMENTOS, INSUMOS Y DROGAS

